

## WO02090553

Publication Title:

RECOMBINANT FUSION PROTEINS AND THE TRIMERS THEREOF

Abstract:

Abstract of WO02090553

Die vorliegende Anmeldung betrifft rekombinante Fusionsproteine, mit der Eigenschaft, Trimere bilden zu können, wobei die rekombinanten Fusionsproteine mindestens eine Komponente A und mindestens eine Komponente B aufweisen, wobei die Komponente B trimerisierende Eigenschaften und die Komponente A biologische Eigenschaften aufweist, sowie Trimere dieser rekombinanten Fusionsproteine. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von derartigen Trimeren zur Herstellung eines Arzneimittels bzw. deren Verwendung zur In-vitro-Diagnose bzw. zur Herstellung eines In-vitro-Diagnosenmittels. Auch DNA-Sequenzen, die für ein derartiges Fusionsprotein kodieren, sowie Expressionsvektoren und Wirtszellen, die die DNA-Sequenz bzw. den Expressionsvektor enthalten, sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/090553 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/62,  
C07K 14/47, 14/525, 19/00, C12N 1/21, 5/10, A61K 38/17

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): APOTECH RESEARCH & DEVELOPMENT  
LTD. [CH/CH]; 84, Rue de Rhone, CH-1204 Genf (CH).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/05103

(22) Internationales Anmeldedatum:  
8. Mai 2002 (08.05.2002)

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TSCHOPP, Jürg  
[CH/CH]; Ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges (CH).  
SCHNEIDER, Pascal [CH/CH]; Tuileries 7, Ch-1066  
Epalinges (CH).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

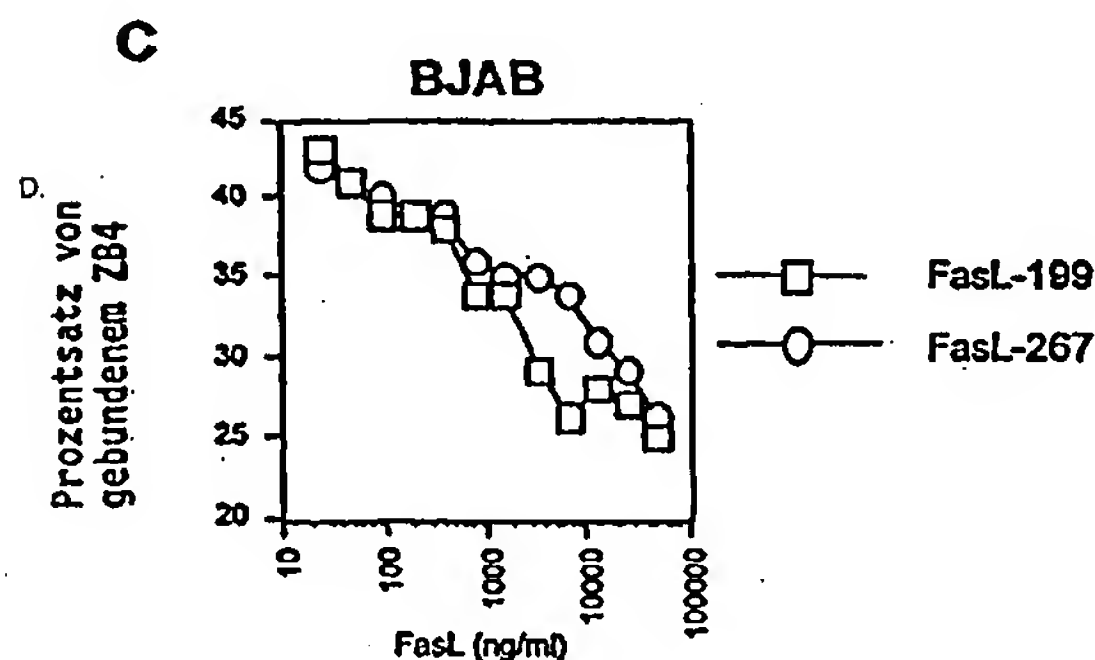
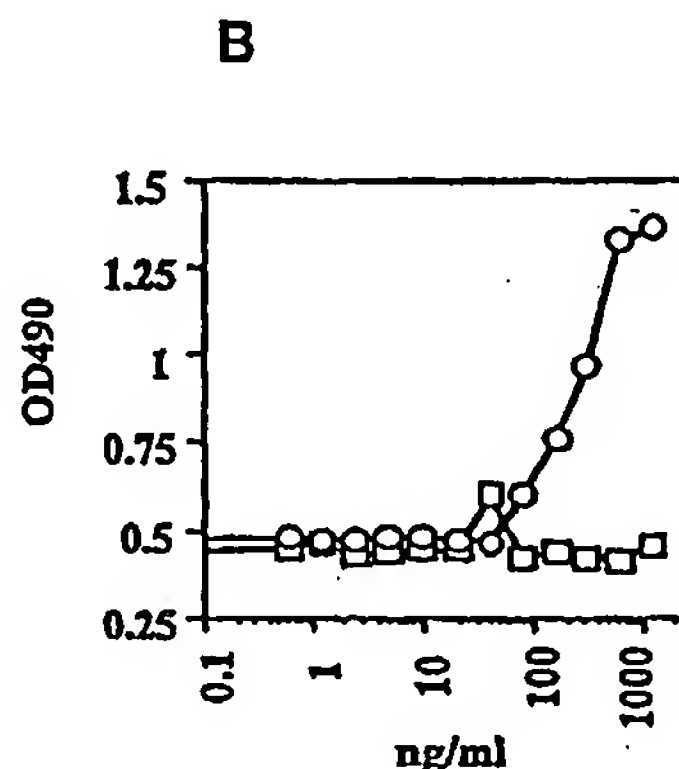
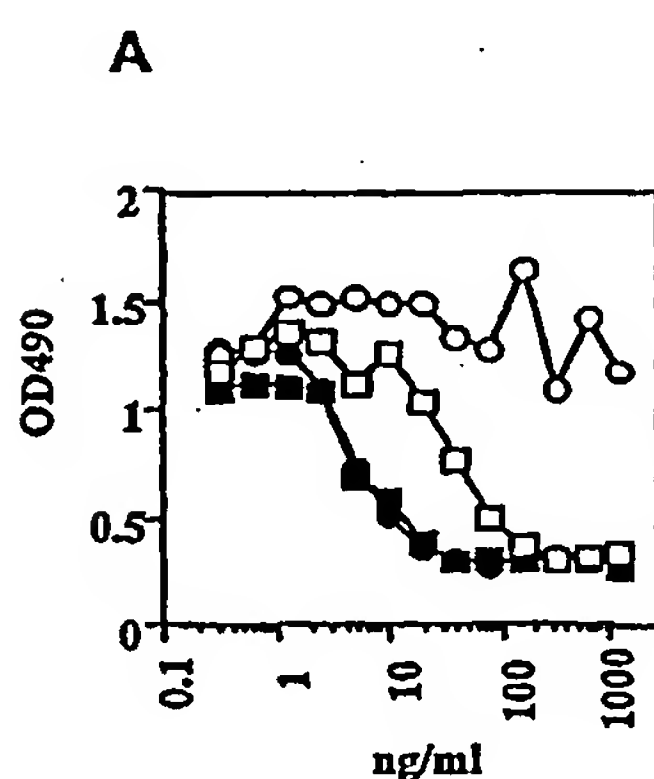
(30) Angaben zur Priorität:  
101 22 140.1 8. Mai 2001 (08.05.2001) DE

(74) Anwalt: GRAF VON STOSCH, ANDREAS; Bosch,  
Graf von Stosch, Jehlé, Theatinerstr. 8, D-80333 München  
(DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: RECOMBINANT FUSION PROTEINS AND THE TRIMERS THEREOF

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE FUSIONSPROTEINE UND DEREN TRIMERE



D...PERCENTAGE OF BONDED ZB4

(57) Abstract: The invention relates to recombinant fusion proteins having the property of being able to form trimers. Said recombinant fusion proteins comprise at least one component A and at least one component B. Component B has trimerizing properties and component A has biological properties. The invention also relates to trimers of said recombinant fusion proteins. The invention further relates to the use of said trimers in the production of a medicament or the use thereof for in-vitro diagnosis or in the production of in-vitro diagnosis agent. The invention also relates to DNA sequences coding for said fusion protein and expression vectors and host cells containing said DNA sequences or expression vector.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Anmeldung betrifft rekombinante Fusionsproteine, mit der Eigenschaft, Trimere bilden zu können, wobei die rekombinanten Fusionsproteine mindestens eine Komponente A und mindestens eine Komponente B aufweisen, wobei die Komponente B trimerisierende Eigenschaften und die Komponente A biologische Eigenschaften aufweist, sowie Trimere dieser rekombinanten Fusionsproteine. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von derartigen Trimeren zur Herstellung eines Arzneimittels bzw. deren Verwendung zur

In-vitro-Diagnose bzw. zur Herstellung

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/090553 A2



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

5

10

### **Rekombinante Fusionsproteine und deren Trimere**

- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinante Fusionsproteine, mit der Eigenschaft, Trimere bilden zu können, wobei die rekombinanten Fusionsproteine mindestens eine Komponente A und mindestens eine Komponente B aufweisen, wobei die Komponente B einen trimerisierende Eigenschaften und die Komponente A biologische Eigenschaften aufweist, sowie Trimere dieser rekombinanten Fusionsproteinen. Weiterhin
- 20 betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von derartigen Trimeren zur Herstellung eines Arzneimittels bzw. deren Verwendung zur In-vitro-Diagnose bzw. zur Herstellung eines in vitro Diagnosemittels. Auch DNA-Sequenzen, die für ein derartiges Fusionsprotein kodieren, sowie Expressionsvektoren und Wirtszellen, die die DNA-Sequenz bzw. den Expressionsvektor enthalten, sind Gegenstand der vorliegenden
- 25 Erfindung.

Proteine, die physiologisch als Trimere auftreten, sind in der Natur in großer Zahl vorhanden. Aufgrund von Wechselwirkungen an den Oberflächen dieser in Lösung trimerisierenden Proteine kann es zu spontanen oder aber auch zu bspw. kinetisch verzögerten, weil konzentrations- oder milieuabhängigen Zusammenlagerungen von Proteinen

30 kommen. Hierfür sind hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, kovalente Bindungen, bspw. Disulfidbrücken, und/oder Coulomb-Kräfte verantwortlich.

- Daneben aber sind bei gewissen Proteinen Struktur motive anzutreffen, die zur Bildung von spezifischen strukture bedingten intermolekularen Supersekundärstrukturen und damit – neben anderen Multimerisierungszuständen - zu Protein trimeren führen. Die Formation von Supersekundärstrukturen beruht auf charakteristischen Aminosäuresequenzen der diese Trimere bildenden Proteine. Als Supersekundärstrukturen wären beispielsweise sog. "Coiled-Coil-Tripelhelices" zu nennen, die eine Trimerisierung von Proteinen durch Interaktionen von charakteristischen  $\alpha$ -Helices, die bei jedem der die Coiled-Coil-Form ausbildenden Proteine auftreten, bewirken. Die Coiled-Coil-Tripelhelix als intermolekulare "Trimerisierungsdomäne" von Proteinen stellt sich strukturell als dreisträngige, umeinander gewundene Superhelix dar. Derartige Coiled-Coil-Motive mit Tripelhelix-Charakter treten insbesondere bei extrazellulären Protein trimeren auf, ganz besonders aber bei Proteinen bzw. Proteinkomplexen des Bindegewebes.
- 15 So etwa beschreiben Beck *et al.* (J. Mol. Biol. (1996) 256, 909-923) ein Bindegewebsprotein, das sog. Cartilage Matrix Protein (CMP), dessen Aggregation zu einem Homotrimer auf einer Tripelhelix, die das Resultat der Zusammenlagerung von drei komplementären Helices (jeweils als Bestandteil eines Polypeptids) darstellt, mit Coiled-Coil-Muster beruht. Charakteristisch für die Aminosäuresequenz einer solchen eine
- 20 Tripelhelix bildenden Helix ist dabei das Heptadmuster (abcdefg)<sub>n</sub>. Deren Aminosäuren in den Positionen a und d tragen gewöhnlich apolare Seitenketten und erlauben dadurch die Ausbildung der oben beschriebenen superhelikalen Struktur, hier als Tripelhelix aus drei Helices.
- 25 Weiterhin treten auch bei Proteinen aus der Kollagenfamilie spezifische strukture bedingte Multimerisierungsphänomene durch die Ausbildung von Supersekundärstrukturen auf. Dabei ist die Struktur von Kollagenfasern durch das Tropokollagen gekennzeichnet, das aus drei helikalen verdrehten Polypeptiden besteht. Auch die Protofibrille eines Haars ist aus einer Tripelhelix aus  $\alpha$ -Keratin mit dem Motiv "Coiled-Coil", al-
- 30 lerdings linksgängig, aufgebaut.

Darüber hinaus sind aufgrund ihrer Sequenzhomologien in ihren jeweiligen multimerisierenden Sequenzabschnitten die Proteine C1q, Kollagen  $\alpha 1$  (X),  $\alpha 2$  (VII), das Überwinterungsprotein, ACRP30, das innere Ohrstrukturprotein, das Cerebellin und das Multimerin als Proteinfamilie unter der Bezeichnung C1q-Familie zusammengefaßt worden (Kischore und Reid, Immunopharmacol., 42 (1999) 15-21), die strukturell bedingt als höhere Aggregate von bspw. Trimeren vorliegen. Unter den in dieser Familie auftretenden Proteinen mit Multimerisierungseigenschaften ist bspw. die Struktur des aus dem Komplementsystem bekannten Proteins C1q durch Monomere charakterisiert, die jeweils eine globuläre sog. "Kopf"-Domänen und einen "kollagenähnlichen" helikalen Sequenzabschnitt aufweisen. Über diesen helikalen Sequenzabschnitt, der eine Coiled-Coil-Tripelhelix bildet, trimerisieren die Monomere. Sechs dieser C1q-Trimere formen wiederum ein Oligomer, wobei wiederum die Oligomerisierung der Proteintrimere auf Interaktionen zwischen den einzelnen Coiled-Coil-Tripelhelices beruht. Im Ergebnis führt diese strukturelle Anordnung beim Protein bzw. multi- (oligo-) merisierten Proteinkomplex C1q zu einem als "Bouquet" bezeichneten Aufbau, wobei sichergestellt wird, daß 18 globuläre, C-terminal angeordnete "Kopf"-Domänen zu einem Hexamer von Trimeren verbunden werden.

Eine ähnliche Struktur wie beim Protein C1q ist auch beim Protein ACRP30, gleichfalls ein Protein aus der C1q-Familie, anzutreffen (Hu *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 271, Nr. 18, 10697-10703, 1996). Bei diesem von Adipozyten sekretierten Serumprotein handelt es sich mit überwiegender Wahrscheinlichkeit um Quattromere von Trimeren, wobei, wie auch beim C1q-Protein, globuläre C-terminale Domänen über kollagenähnliche Tripelhelices verbunden werden. Mutmaßlich vier dieser Tripelhelices formen schließlich wiederum ein Oligomer durch entsprechende Interaktionen. In der Veröffentlichung von Shapiro und Scherer (Current Biology 1998, 8:335-338) findet sich die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse ermittelte Struktur eines Homotrimers von ACRP30 dargestellt.

Weiterhin sind aus der Literatur Proteine aus der Klasse der Collectine bekannt, die durch eine kollagenartige Domäne, eine Halsregion und darüber hinaus durch eine globuläre carboxyterminale Lectinbindungsdomäne charakterisiert sind. Auch die Col-



lectine treten physiologisch als Oligomere von Trimeren auf. So trimerisieren beispielsweise die Proteine Lung Surfactant Protein A (SP-A) und das Mannose-Bindungsprotein (MBP), jeweils aus der Familie der Collectine, durch die Interaktionen ihrer "kollagenähnlichen" Domäne und liegen schließlich als Hexamere von Trimeren vor (Epstein et al., Current Opinion in Immunology, Vol. 8, Nr. 1, 1996, 29-35). Demgemäß bilden also auch die unter der Bezeichnung Collectine bekannten Proteine Oligomere (bspw. Hexamere) von Multimeren (bspw. Trimere) aus.

Aus der Literatur ist zudem zu entnehmen, daß zahlreiche physiologisch als Signalmoleküle wirkende Proteine ein biologisches Signal nur in bestimmten Zuständen transduzieren können. So ist beispielsweise membranständig angeordnetes FasL biologisch, d.h. apoptotisch, wirksam, während nach Abspaltung des extrazellulären Proteinabschnitts von dem membranständigen Abschnitt (sog. sFasL) diese nicht-membrangebundene sFasL-Fraktion physiologisch keine apoptotische Wirkung auf Zielzellen mehr hervorrufen kann. In der Veröffentlichung von Schneider *et al.* (J. Exp. Med., Vol. 187, Nr. 8, 1998, 1205-1213) wurde beschrieben, daß die biologische Wirkung von sFasL-Trimeren, die - wie zuvor erläutert - nach Abspaltung vom membranständigen Proteinabschnitt erhalten werden, gleichwohl durch den Einsatz von vernetzenden Antikörpern in Hinblick auf deren physiologische Funktion reaktiviert werden kann. Hierzu wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus der Trimerisierungsdomäne von FasL, einer kurzen Linkersequenz und einer Flag-Markierung (mit der Flag-Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) DYKDDDDK) konstruiert, exprimiert, und derartige nicht-strukturbedingt (also nicht über spezifische Sekundärstruktur-Interaktionen mit dem Ergebnis der Bildung einer Supersekundärstruktur) trimerisierte Fusionsproteine durch gegen die Flag-Markierung gerichtete Antikörper vernetzt.

In der nicht veröffentlichten deutschen Patentanmeldung DE 19963859 werden Bi- oder Oligomere von Di-, Tri-, Quattro- oder Pentameren, also Aggregate höherer Ordnung, offenbart, die aus rekombinanten Fusionsproteinen aufgebaut sind, die zwei Komponenten A und B umfassen. Um bspw. die biologische (apoptotische) Wirksamkeit von TNF-Cytokinen zu erhöhen, können gemäß der DE 19963859 die rekombinanten Fusionsproteine als Komponente A bspw. ein TNF-Cytokin aufweisen und als

Komponente B einen Proteinabschnitt, der die rekombinanten Fusionsproteine zu Aggregate höherer Ordnung verbindet.

Wenn auch bei vielen medizinischen Indikationen derartige Komplexe mit hoher apoptotischer Wirkung erwünscht sind, ist es gleichwohl zur Behandlung zahlreicher Erkrankungen erforderlichen, Substanzen zur Verfügung zu stellen, die die Auslösung apoptotischer Ereignisse zuverlässig blockieren. Aus der Veröffentlichung von Suda et al. (J. Exp. Med. 1997, 186, S. 2045-2050) ist bekannt, daß lösliche FasL-Trimere die Apoptose, die durch ein oligomerisierte Moleküle induziert wird, unter gewissen Umständen blockieren können. Substanzen auf bspw. Proteinbasis, die zuverlässig am Rezeptor selbst die Auslösung bspw. apoptotischer Ereignisse blockieren können, nicht-nativer Natur sind und daher besser gegen eine physiologische Degradation in vivo geschützt sind, sind im Stand der Technik jedoch nicht bekannt.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, solche Substanzen zur Verfügung zu stellen, die als Biomoleküle eine biologisch blockierende Funktion am Rezeptor selbst entfalten können, so daß bspw. die Auslösung der apoptotischen Signaltransduktionskette unterdrückt wird.

Die vorliegende Aufgabe wird durch den Gegenstand des Anspruchs 1, nämlich durch Trimere rekombinanter Fusionsproteine, die mindestens eine Komponente A und mindestens eine Komponente B aufweisen, wobei die Komponente A ein Protein oder einen Proteinabschnitt mit biologischer Funktion, insbesondere mit Bindungsfunktion, umfaßt und die Komponente B ein Protein oder einen Proteinabschnitt umfaßt, das/der die rekombinanten Fusionsproteine ohne Wirkung von Drittmolekülen trimerisiert, d.h. ein Trimer von biologisch wirksamen Komponenten A erzeugt. Erfindungsgemäß werden also Trimere zur Verfügung gestellt, die keine Aggregate höherer Ordnung, bspw. Dimere von Trimeren, bilden können, sondern vielmehr in Lösung im wesentlichen, mindestens zu 90 %, vorzugsweise zu mindestens 95 % und ganz besonders bevorzugt zu mindestens 99 %, jeweils bezogen auf die Gesamtzahl der Trimere, als trimerisierte rekombinante Fusionsproteine vorliegen.



- Unter einem Protein oder Proteinabschnitt mit biologischer Funktion (Komponente A im Fusionsprotein) sind insbesondere Proteine, die eine Ligandenfunktion, ganz besonders für Antikörper oder Rezeptoren, haben (also als Bindungspartner mit einem oder mehr Molekül(en) in Wechselwirkung treten können), modifizierte Aminosäuresequenzen, z.B. Aminosäuresequenzen mit kovalent oder nicht-kovalent angekoppelten Wirkstoffen (ggf. organisch-chemischer Natur), Antikörper oder Abschnitte von Antikörpern mit Paratopen oder auch Hormone, bspw. Peptidhormone, zu verstehen. Hierbei beruht die vorliegende Erfindung auf der Erkenntnis, daß insbesondere Signalproteine, die oder deren Abschnitte oder Derivate erfindungsgemäß als Komponente A eingesetzt werden, biologisch erst als Aggregate höherer Ordnung aktiv sind, dagegen als Trimere in vitro und in vivo an Rezeptoren binden, diese aber nicht aktivieren, sondern vielmehr kompetitiv die Bindungsstellen besetzen und kein biologisch aktivierendes Signal auslösen können, sondern ausschließlich blockieren.
- 15 Bei physiologisch membranständigen Signalproteinen, bspw. bei TNF-Cytokinen, werden als Komponente A eines trimerisierenden rekombinante Signalproteins Spaltprodukte, die die extramembranösen, insbesondere die extrazellulären Proteinabschnitte, umfassen, bevorzugt. Aber auch Aminosäuresequenzen, die als Antigene wirken können, können als Komponente A im rekombinanten Fusionsprotein eingesetzt werden. Schließlich können als Komponente A auch Rezeptoren, z.B. Rezeptoren aus der TNF-Rezeptorfamilie (bspw. FasR), oder Abschnitte bzw. Derivate solcher Rezeptoren zum Einsatz kommen, die gleichfalls Bindungsfunktion haben (damit also als Bindungspartner mit einem anderen Molekül, bspw. membranständigem FasL, in Wechselwirkung treten) und i.S. der vorliegenden Erfindung daher auch unter den Begriff
- 20 "Ligand" fallen. Derartige bindungsfähige Fragmente von biologischen Rezeptoren eignen sich insbesondere zur Verwendung als Arzneimittel, wenn der komplementäre biologische Ligand beim Patienten in unphysiologisch hohen Konzentrationen vorliegt.
- 25
- 30 In einer bevorzugten Ausführungsform können die Komponenten A die in erfindungsgemäßen Trimeren vorliegen, identische Komponenten A (Homotrimere) oder unterschiedliche Komponenten A (Heterotrimere) aufweisen, d.h. es können verschiedene

rekombinante Fusionsproteine ein erfindungsgemäßes Trimer bilden. Auf diese Weise können Proteine mit verschiedenen Komponenten A, ggf. mit unterschiedlicher biologischer Funktion, im erfindungsgemäßen Trimer verbunden sein. Hierbei können die Komponenten A von zwei rekombinanten Proteinen identisch sein und das dritte Fusionsprotein hinsichtlich seiner Komponente A abweichen oder auch alle drei Fusionsproteine sich in Hinblick auf die Komponente A unterscheiden. Auf diese Weise werden durch die Wahl, die Anordnung, die spezifische Kombination und/oder durch die Anzahl der Komponenten A im Trimer typischerweise fein modulierte inhibitorische, ggf. in Kombination mit aktivierenden, Wirkungen erzielt werden können.

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Komponente A im rekombinanten Fusionsprotein um ein Peptidhormon, einen Wachstumsfaktor, ein Cytokin, ein Interleukin oder einen Abschnitt derselben, vorzugsweise um einen bindungsfähigen Abschnitt. Aber auch funktionelle Derivate der vorgenannten Peptide, Proteinabschnitte und/oder Proteine können als Komponente A im rekombinanten Fusionsprotein, das Bestandteil eines erfindungsgemäßen Trimers ist, zum Einsatz kommen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen trimeren rekombinanten Fusionsproteins umfaßt dessen Komponente A einen Rezeptor, beispielsweise einen Rezeptor für ein Peptidhormon, einen Wachstumsfaktor, ein Cytokin, ein Interleukin, oder es handelt sich bei der Komponenten A des erfindungsgemäßen Fusionsproteins um einen Abschnitt bzw. ein Derivat eines derartigen Rezeptors. Besonders bevorzugte Beispiele für einen solchen Rezeptor sind Rezeptoren aus der TNF-Rezeptorfamilie, insbesondere FasR (im folgenden auch lediglich als Fas bezeichnet).

Als funktionelle Derivate von biologisch aktiven Proteinen, Proteinabschnitten oder Peptiden werden insbesondere solche Proteine bezeichnet, die die biologische Funktion, insbesondere die Bindungseigenschaft an den Interaktionspartner, bspw. den membranständigen Rezeptor, aufrechterhalten, gleichwohl aber Sequenzunterschiede zu den entsprechenden nativen Sequenzen aufweisen. Bei diesen Sequenzabweichun-

gen kann es sich um eine oder mehr Insertion(en), Deletion(en) und/oder Substitution(en) handeln, wobei eine Sequenzhomologie von mindestens 70% bevorzugt und eine Sequenzhomologie von mindestens 85 % zwischen dem eingesetzten Derivat und der nativen Sequenz stärker und mindestens 90 % ganz besonders bevorzugt ist. Insbesondere fallen unter den Begriff der funktionellen Derivate solche Aminosäuresequenzen, die gegenüber den physiologischen Sequenzen konservative Substitution aufweisen. Als konservative Substitutionen werden solche Substitutionen bezeichnet, bei denen Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht werden, die aus der gleichen Klasse stammen. Insbesondere gibt es Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten, positiv oder negativ geladenen Seitenketten, aromatischen Gruppen in der Seitenketten oder Aminosäuren, deren Seitenketten Wasserstoffbrücken eingehen können, bspw. Seitenketten, die eine Hydroxyfunktion besitzen. Das bedeutet, daß bspw. eine Aminosäure mit einer polaren Seitenkette durch eine andere Aminosäure mit einer gleichfalls polaren Seitenkette ersetzt wird oder beispielsweise eine durch eine hydrophobe Seitenkette gekennzeichnete Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit gleichfalls hydrophober Seitenkette substituiert wird (z.B. Serin (Threonin) durch Threonin (Serin) bzw. Leucin (Isoleucin) durch Isoleucin (Leucin)). Insertionen und Substitutionen sind insbesondere an solchen Sequenzpositionen möglich, die keine Veränderung der dreidimensionalen Struktur hervorrufen oder den Bindungsbereich betreffen. Eine Veränderung einer dreidimensionalen Struktur durch Insertion(en) oder Deletion(en) ist bspw. mit Hilfe von CD-Spektren (Zirkulardichroismus-Spektren) leicht überprüfbar (Urry, 1985, Absorption, circular Dichroism and ORD of Polypeptides, in: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al. (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam). Geeignete Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit Aminosäuresequenzen, die gegenüber der (den) nativen Sequenzen Substitutionen aufweisen, werden bspw. in den Druckschriften US 4,737,462, US 4,588,585, US 4,959,314, US 5,116,943, US 4,879,111 und US 5,017,691 offenbart. Die Herstellung von Derivaten ist insbesondere auch bei Sambrook et al, (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben, wobei Codons weggelassen, ergänzt oder ausgetauscht werden können. Derivate können insbesondere auch solche Proteine sein, die stabilisiert sind, um der physiologischen Degradation zu entgehen, bspw. durch Stabilisierung des Proteinrückgrats durch Substitution der

durch Stabilisierung des Proteinrückgrats durch Substitution der amidartigen Bindung, bspw. auch durch den Einsatz von  $\beta$ -Aminosäuren.

Unter einem Liganden werden i.S. der vorliegenden Erfindung alle an Bindungsreaktionen beteiligten Moleküle verstanden. Bei einem Liganden kann es sich demnach auch um ein normalerweise als Rezeptor bezeichnetes Protein handeln. Auch ein solcher Rezeptor kann "Ligand" i.S. dieser Erfindung sein, bspw. wenn er an seinen Interaktionspartner, z.B. ein Signalmolekül, bindet.

- 10 Besonders bevorzugt ist ein Trimer von rekombinanten Fusionsproteinen dann, wenn die Komponente A im rekombinanten Fusionsprotein ein Cytokin aus der Familie TNF-Cytokine, ein Abschnitt eines solchen TNF-Cytokins oder ein funktionelles Derivat eines TNF-Cytokins oder eines entsprechenden TNF-Cytokin-Abschnitts ist. Dabei kann die biologische Wirkung der eingesetzten TNF-Cytokine bei den Zielzellen durch
- 15 Bindung an die entsprechenden Rezeptoren in vivo (z.B. bei der Bindung in Form eines Aggregats höherer Ordnung) bspw. apoptotische, proliferative oder aktivierende Wirkungen hervorrufen, typischerweise als Trimer dann aber nur noch die Bindung an den jeweiligen Rezeptor sicherstellen, jedoch nicht mehr die aktivierende Funktion ausüben. In einer nicht abschließenden Aufzählung kommen als TNF-Cytokine und
- 20 damit als Komponente A im Fusionsprotein insbesondere die Proteine OX40L, RANKL, TWEAK, Lta, Ltab2, LIGHT, CD27L, 41-BB, GITRL, APRIL, VEGI und BAFF bzw. deren Abschnitte oder Derivate in Betracht. Ganz besonders bevorzugt sind die Proteine CD40L, FasL, TRAIL, TNF (insbesondere TNF, das an den Rezeptor TNF-R2 bindet), CD30L und EDA bzw. deren Abschnitte oder Derivate. Als Kompo-
- 25 nente A im rekombinanten Fusionsprotein werden dabei bevorzugt extrazelluläre Abschnitte der vorgenannten membranständigen TNF-Cytokine oder deren funktionelle Derivate verwendet. Ganz besonders bevorzugt sind diese Spaltprodukte dann, wenn insbesondere deren Bindungsvermögen an den jeweiligen Rezeptor erhalten bleibt. Auch funktionelle Derivate, im oben genannten Sinn, der vorgenannten TNF-
- 30 Cytokine oder Abschnitte der TNF-Cytokine können als Komponente A des Fusionsproteins zum Einsatz kommen. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Komponente A des rekombinanten Fusionsproteins, das Bestandteil des erfin-



derungsgemäßen Trimers ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus hFasL (AA 139-281), hTRAIL (AA 95-281), hCD40L (AA 116-261) und m oder hTNF $\alpha$  (AA 77-235).

Erfindungsgemäß ergeben sich demnach folgende Möglichkeiten: Die für ein rekombinantes Fusionsprotein, das Bestandteil eines erfindungsgemäßen Oligomers werden soll, ausgewählte Komponente A liegt bereits als solche in Lösung als Trimer. Die Komponente B wird in einem solchen Fall die Trimerisierung der Komponenten A nur noch verstärken. Diese Situation findet sich bspw. dann, wenn die Komponente A, bspw. ein TNF-Ligand bzw. ein Abschnitt oder Derivat desselben, die bereits in Lösung typischerweise trimerisiert ist, durch die Komponente B in seiner trimeren Gestalt weiter stabilisiert werden soll. Für den Fall jedoch, daß die Komponente A eines rekombinanten Fusionsproteins als solche in Lösung bzw. in vivo keine durch Oberflächen-Wechselwirkung vermittelte Trimerstruktur zeigt, wird die Komponente B erfindungsgemäß eine Trimerisierung der Komponente A der rekombinanten Fusionsproteine sicherstellen müssen. Letzteres tritt bspw. typischerweise dann ein, wenn als Komponente A des rekombinanten Fusionsproteins nur Abschnitte des nativen Proteins verwendet werden, die als solche nicht trimerisieren können oder zumindest in vivo nicht als Trimer vorliegen, weil bspw. das Gleichgewicht stark auf die Seite des Monomers verschoben ist, also bspw. Abschnitte von Cytokinen, insbesondere C-terminale Abschnitte (bspw. umfassend mindestens 100 AS (jeweils gerechnet vom C-Terminus), vorzugsweise mindestens 120 AS und insbesondere bevorzugt mindestens 150 AS vom C-Terminus) von FasL, CD40L, CD30L, TRAIL, EDA oder TNF.

Bei der Komponente A des rekombinanten Fusionsproteins kann es sich aber in einer bevorzugten Ausführungsform auch um eine Aminosäuresequenz nach Maßgabe der vorliegenden Erfindung handeln, die dazu geeignet ist, als Träger für einen Rezeptoragonisten oder Rezeptorantagonisten zu fungieren. So etwa kann ein als pharmakologischer Wirkstoff aktives, kleines organisch-chemisches Molekül typischerweise kovalent an eine derartige Aminosäuresequenz angekoppelt werden, beispielsweise über eine Etherbindung an Threonin oder Serin, eine amidartige Bindung oder über eine Esterbindung. Derartige angekoppelte Agonisten oder Antagonisten können die Bindungskonstante eines erfindungsgemäßen Trimers erhöhen, vorzugsweise auf Werte

von mindestens  $10^{-9} \text{ M}^{-1}$ , oder die biologische Wirkung modulieren, insbesondere das inhibitorische Verhalten eines erfindungsgemäßen Trimers, insbesondere in Hinblick auf die Inhibition der Auslösung der apoptotischen Signalkaskade, verstärken. Darüber hinaus kann ein erfindungsgemäßer Trimer als Träger pharmakologisch wirksamer Substanzen eingesetzt werden. Auf diese Weise kann ein pharmakologischer Wirkstoff durch die Wahl eines entsprechenden erfindungsgemäßen Trägertrimers selektiv in räumliche Nachbarschaft bestimmter Zellen, die den pharmakologischen Angriffsort dieser Wirkstoffe darstellen gebracht werden. In Betracht kommt bspw. die Kopplung eines derartigen Wirkstoffes an ein FasL-Trimer, wobei die Bindung des FasL-Trimers den FasR blockiert (und damit erfindungsgemäß die Apoptose inhibiert, der Zelle damit das Überleben sichert), während der Wirkstoff unmittelbar auf die Zielzelle gebracht wird. Eine Verwendung eines diesbezüglichen Systems könnte sich bspw. ergeben, wenn als Wirkstoff cytotoxische Substanzen mit dem Trimer verknüpft werden, die einen Angriff von Immunzellen gegen die Zielzellen verhindern, bspw. bei degenerativen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen, vor allem Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer. Im Falle von Morbus Parkinson kann auf diese erfindungsgemäße Weise der Untergang der Dopamin erzeugenden Zellen in der Substantia Nigra verhindert werden. Allgemein wird daher der Einsatz derartiger Systeme von erfindungsgemäßigem Träger und ggf. kovalent angekoppelter Wirkstoffkomponente als Arzneimittel in der Human- oder Veterinärmedizin offenbart.

Bei der Komponente B des rekombinanten Fusionsproteins wird es sich typischerweise um ein Protein aus der Familie der C1q-Proteine oder der Collectine handeln. Besonders bevorzugt sind die Proteine der C1q- oder der Collectinfamilie als Bestandteil des rekombinanten Fusionsproteins, nämlich als Komponente B, dann, wenn nur deren Trimerisierungsdomäne, nicht aber deren Oligomerisierungsdomäne als Bestandteil des rekombinanten Fusionsprotein transkribiert bzw. translatiert wird. Vorzugsweise wird die Komponente B im rekombinanten Fusionsprotein auch die für die vorgenannten Proteine im nativen Zustand charakteristische globuläre "Kopf"-Domäne nicht enthalten. Die vorgenannte Komponente B in einem erfindungsgemäßen rekombinanten Fusionsprotein wird also eine Sequenz aufweisen, die typischerweise nur den bspw. kollagenartigen Abschnitt enthält, der die Funktionalität zur Trimerisierung durch



Ausbildung einer Tripelhelix aufweist, nicht aber jene Sequenzabschnitte, die darüber hinaus die Fähigkeit besitzen, mit anderen Tripelhelices eine Bi- oder Oligomerstruktur (bspw. ein Tetra- oder Hexamer von bspw. Tripelhelices) einzugehen.

- 5    Typischerweise wird daher das trimerisierende Fusionsprotein nur die für die Trimerisierung verantwortlichen Domänen der Proteine aus den Familien der C1q-Proteine oder Collectine als Komponente B aufweisen, während deren jeweilige "Kopf"-Domänen durch andere, gleichfalls eine biologische Funktion wahrnehmende Proteine oder Proteinabschnitte als Komponente A ersetzt werden. Der Begriff "rekombinantes Fusionsprotein" ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung also so zu verstehen, daß
- 10    die mindestens eine Komponente A und die mindestens eine Komponente B im rekombinanten Fusionsprotein artifiziell fusioniert sind, d.h., daß ein Fusionsprotein i.S. der vorliegenden Erfindung keinem natürlich auftretenden Protein entspricht.
- 15    Auch funktionelle, d.h. trimerisierende, Derivate von Proteinen aus der C1q-Protein-Familie oder der Familie der Collectine bzw. funktionelle Derivate von Abschnitten der vorgenannten Proteine können als Komponente B für die Aggregation von rekombinanten Fusionsproteinen zu Trimeren zum Einsatz kommen. Dabei wird beispielsweise die Komponente B die entsprechenden Sequenzabschnitte der Proteine C1q,
- 20    MBP, SP-A ("lung surfactant protein A"), SP-D ("lung surfactant protein D"), BC (Bovines Serumconglutinin), CL43 (Bovines Collectin-43) und/oder ACRP30 oder auch von funktionellen Derivaten dieser Proteinabschnitte enthalten.

- Besonders bevorzugt sind Trimere von rekombinanten Fusionsproteinen dann, wenn
- 25    die Komponente B des rekombinanten Fusionsproteins einen Proteinabschnitt des Proteins C1q oder des Proteins ACRP30 mit einem Sequenzabschnitt von mindestens 8 AS Länge, typischerweise mindestens 20 AS Länge aus den kollagenartigen Sequenzbereichen, die eine Tripelhelix bilden, oder ein funktionelles Derivat derselben aufweist. Als ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung
- 30    stellen sich Trimere von rekombinanten Fusionsproteinen dar, deren Komponente B eine Aminosäuresequenz gemäß Figur 1 (eingerahmte Sequenz, AS 45 bis 111) oder ein funktionelles Derivat dieser murinen (m: murin) Aminosäuresequenz (bspw. die

analoge humane Sequenz oder die analoge Sequenz eines anderen Säugetiers) bzw. einen Abschnitt dieser Sequenz enthält.

Insbesondere bevorzugt sind Trimere solcher Fusionsproteine, die Sequenzen aus verschiedenen Wirtsorganismen aufweisen. Ganz besonders bevorzugt sind erfindungsgemäße Aggregate dann, wenn sie aus chimären Fusionsproteinen stammen, wobei die Komponente A aus einer anderen Tierart stammt als die Komponente B. Derart kann es vorteilhaft sein, daß die Komponente A einer Aminosäuresequenz aus der Maus, Ratte, Schwein oder einem anderen Vertebraten, insbesondere aus einem Säuger, oder einem funktionellen Derivat derselben entspricht und die Komponente B humanen Ursprungs ist oder umgekehrt. Andererseits bevorzugt können die Sequenzen der Komponente A und der Komponente B in einem erfindungsgemäßen Fusionsprotein, das ein erfindungsgemäßes Trimer bildet, aber auch aus der gleichen Tierart stammen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Trimerisierung der rekombinanten Fusionsproteine durch eine kurze Aminosäuresequenz von mehr als 6 Aminosäuren, vorzugsweise von 8 bis 30, ganz besonders bevorzugt von 8 bis 20 Aminosäuren, die in den rekombinanten Fusionsproteinen als Komponente B vorhanden ist. Die durch diese kurzen Aminosäuresequenzen erreichte Trimerisierung von Fusionsproteinen, beruht typischerweise auf der Ausbildung von Supersekundärstrukturen, insbesondere auf der Ausbildung von „coiled-coil“-Tripelhelices. Hierzu sind bspw. alle Sequenzabschnitte von Proteinen geeignet, die durch Ausbildung von Supersekundärstrukturen Trimere generieren, z.B. typische Kollagen-artige Tripelhelices bzw. Abschnitte derselben (wie sie z.B. bei den Proteinen CMP, COMP, Kollagen oder Laminin).

Da die zur Trimerisierung führende Komponente B des rekombinanten Fusionsproteins erfindungsgemäß im wesentlichen keine höheren Aggregate bilden sollte, sollte die Komponente B typischerweise keinen Cysteinrest aufweisen, der eine intermolekulare Disulfidbrücke ausbilden kann. Vorzugsweise wird die Komponente B in einem rekombinanten Fusionsprotein daher keinen Cysteinrest oder nur solche Cysteinreste, die eine intramolekulare Disulfidbrücke, also im rekombinanten Fusionsprotein selbst,

besitzen, um zu vermeiden, daß unter oxidierenden Bedingungen eine kovalente Verknüpfung mit dem mindestens einen Cysteinrest eines Fusionsproteins eines anderen Trimers auftreten kann.

- 5 Das Fusionsprotein kann neben den Komponenten A und B zusätzliche Sequenzabschnitte aufweisen. Bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung in diesem Zusammenhang sog. Tag-Sequenzen, beispielsweise mindestens ein Flag-Tag, also die Aminosäurenfolge DYKDDDDK, und/oder aber auch beispielsweise mindestens ein His-Tag (enthaltend mehrere konsekutive Histidine, bspw. mindestens 5) und/oder
- 10 weitere Tag- oder antigenische Sequenzen. Darüber hinaus können die einzelnen Abschnitte (Komponenten A, B oder Tagsequenzen, wobei auch zwei oder mehr Komponenten A im erfindungsgemäßen Fusionsprotein auftreten können) eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins durch Linkersequenzen voneinander getrennt sein. Diese Linkersequenzen (mindestens 2 AS, vorzugsweise mindestens 5 AS) dienen zur struk-
- 15 turellen Abtrennung der verschiedenen funktionellen Komponenten im rekombinanten Fusionsprotein und können bevorzugt auch eine "Scharnier"-Funktion übernehmen, d.h. eine Aminosäuresequenz flexibler Struktur darstellen. Ganz besonders bevorzugt sind solche Linker, die mindestens eine proteolytische Schnittstelle enthalten, die es erlaubt, die Komponenten A von den Komponenten B abzutrennen. Bei der proteolyti-
- 20 schen Schnittstelle im Linker handelt es sich vorzugsweise um eine Thrombin-Konsensussequenz.

- Die Komponente A kann grundsätzlich C- oder N-terminal von der Komponente B angeordnet sein, vorzugsweise C-terminal. Die Tag-Sequenzen können an jeder Posi-
- 25 on eines erfindungsgemäßen rekombinanten Fusionsprotein auftreten, vorzugsweise am N-Terminus.

- Als weiterer Erfindungsgegenstand der vorliegenden Erfindung werden auch Verfahren offenbart, die zur Blockierung von zellulären extramembranösen Rezeptoren die-
- 30 nen. Derartige Verfahren zeichnen sich durch Rekombination mindestens einer Komponente A, die einem Protein oder Proteinabschnitt mit biologischer Funktion entspricht, mit mindestens einer trimerisierenden Komponente B aus, wobei zunächst (a)

ein derartiges rekombinantes Fusionsprotein, bspw. in einem Expressionsvektor, exprimiert wird, (b) isoliert wird und dann (c) für in vitro Untersuchungen einer Zellkultur, bspw. einer Zellsuspension, zugegeben wird. Damit ist das vorliegende Verfahren geeignet, für in vitro Untersuchungen, Zellen bspw. vor dem apoptotischen Zelltod zu bewahren. Derartige Zellen mit verfahrensgemäß gebundenen erfindungsgemäßen Trimeren können dann für weitere in vitro Untersuchungen eingesetzt werden oder auch zur Herstellung eines Arzneimittels dienen. Im Falle einer hohen Bindungskonstante können derartige in vitro behandelte Zellen retransplantiert werden. Bspw. kommt eine derartige Vorgehensweise bei Autoimmunerkrankungen oder degenerativen Erkrankungen in Betracht, um die Zellen vor einem apoptotischen Untergang in vivo zu bewahren.

Ganz besonders bevorzugt ist ein Verfahren obiger Art dann, wenn die Komponente A ein TNF-Cytokin, ein Abschnitt eines TNF-Cytokins oder ein funktionelles Derivat eines solchen Proteins oder Proteinabschnitts ist.

Trimere der vorliegenden Erfindung kommen zur Herstellung eines Arzneimittels bzw. zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen zum medizinischen, d.h. sowohl zum human- als auch zum veterinärmedizinischen Einsatz, in Betracht, insbesondere wenn die Komponente A ein Signalprotein oder ein Abschnitt eines solchen oder ein Derivat des Proteins oder Abschnitts ist. Ein weites Spektrum von Erkrankungen oder Störungen kann mit den erfindungsgemäß beanspruchten Trimeren (Hetero- oder Homotrimere) behandelt werden. Ihre Verwendung ist insbesondere dann gegeben, wenn erhöhte extrazelluläre Konzentrationen der entsprechenden physiologischen Liganden oder eine Erhöhung der Zahl der membranständigen Rezeptoren bei einem Krankheitsbild auftreten/auftritt. Hierbei kann es sich auch um erhöhte Konzentrationen von membranständigen Signalmolekülen, bspw. TNF-Cytokinen (bspw. FasL), auf den Zellen selbst oder von löslichen Signalmolekülen, bspw. nach Proteasespaltung löslichem TNF-Cytokin, handeln. In einer keinesfalls abschließenden Aufzählung können derartige erfindungsgemäße Trimere bspw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von hyperinflammatorischen Störungen, Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen, die auf hyperapoptotischen Reaktionen beruhen, oder degenerativen, ins-

besondere neurodegenerativen Erkrankungen (bspw. Morbus Parkinson), ggf. auch viralen Infektionen eingesetzt werden. Erfindungsgemäße Trimere sind dann ganz besonders geeignet, wenn die Erkrankung eine Behandlung erforderlich macht, die die biologische Wirkung von nativen Cytokinen verhindern möchte, also zur Blockade  
5 entsprechender Cytokin-Rezeptoren dient. Als Beispiele wäre zu nennen: Behandlung von viraler Hepatitis (HBV, HCV), Alkohol- induzierte Hepatitis-Erkrankungen, cholestatische Hepatitis, Morbus Wilson, Hepatitis wegen Störung des Autoimmunsystems, von Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantation, GvHD, TEN (toxische epidermale Nekrolyse), Hashimoto Thyroiditis oder Multiple Sklerose.

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind DNA-Sequenzen, die für Fusionsproteine der vorgenannten Art kodieren. Derartige DNA-Sequenzen werden in Expressionsvektoren exprimiert, wobei auch die entsprechenden Expressionsvektoren, die eine DNA-Sequenz für die erfindungsgemäßen Fusionsproteine enthalten, Gegen-  
15 stand der Erfindung sind. Weiterhin gehören zur vorliegenden Erfindung solche Wirtszellen, die mit DNA-Sequenzen, die für die erfindungsgemäßen Fusionsproteine kodieren, transfiziert sind. Ganz besonders bevorzugt sind in diesem Zusammenhang Wirtszellen, die mit Expressionsvektoren transfiziert sind, wobei die Expressionsvektoren wiederum DNA-Sequenzen enthalten, die für die erfindungsgemäßen Fusionsproteine  
20 kodieren. Alle vorgenannten Gegenstände nach dieser Erfindung kommen als Arzneimittel bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere zur Behandlung von Erkrankungen, die in der vorliegenden Patentanmeldung offenbart sind, ggf. als Bestandteil einer Zusammensetzung in Betracht.

25 Die erfindungsgemäßen Trimere bzw. die weiteren Gegenstände der vorliegenden Erfindung werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt so zur Herstellung eines Arzneimittels bzw. zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen oder Störungen verwendet, daß sie zur parenteralen, d.h. beispielsweise subkutanen, intramuskulären, intraarteriellen oder intravenösen, oder oralen oder intranasalen oder analen,  
30 intraperitonealem, vaginalen oder bukkalen, intrazerebralen, intraokularen Verabreichung (Injektion oder Infusion) , ggf. auch zur topischen Applikation, geeignet sind.



Die erfindungsgemäßen Trimere bzw. Wirtszellen, die erfindungsgemäße Trimere bilden, oder die DNA-Sequenzen, die für rekombinante Fusionsproteine codieren, die Trimere bilden können, oder entsprechende Expressionsvektoren können jeweils als solche als Arzneimittel dienen bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels herangezogen werden. Sie können aber auch in Kombination mit anderen aktiven Wirkstoffkomponenten bzw. pharmazeutischen Hilfs-, Träger- oder Zusatzstoffen als Arzneimittel zum Einsatz kommen. Die erfindungsgemäßen Trimere oder die weiteren Erfindungsgegenstände können damit als Bestandteile in Kombination mit pharmazeutisch akzeptablen Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen kombiniert werden. Offenbart werden nach Maßgabe der vorliegenden Erfindung daher auch (pharmazeutische) Zusammensetzungen, enthaltend erfindungsgemäße Gegenstände, insbesondere erfindungsgemäße Trimere. Entsprechende Herstellungswege sind bei "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980) offenbart, das vollinhaltlich Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung ist. Für die parenterale Verabreichung kommen als Trägerstoffe bspw. steriles Wasser, sterile Kochsalzlösungen, Polyalkylenglykole, hydrogenierte Naphthalen und insbesondere biokompatible Lactidpolymere, Lactid/Glycolidcopolymer oder Polyoxyethylen-/Polyoxypropylencopolymere in Betracht. Erfindungsgemäße Zusammensetzungen können Füllsubstanzen oder Substanzen, wie Lactose, Mannitol, Substanzen zur kovalenten Anknüpfung von Polymeren, wie z.B. Polyethylenglykol an erfindungsgemäße Inhibitoren, Komplexierung mit Metallionen oder Einschluß von Materialien in oder auf besondere Präparationen von Polymerverbindung, wie z.B. Polylaktat, Polyglykolsäure, Hydrogel oder auf Liposomen, Mikroemulsion, Micellen, unilamelare oder multilamelare Vesikel, Erythrozyten-Fragmente oder Sphäroplasten, enthalten. Die jeweiligen Ausführungsformen der Zusammensetzungen werden abhängig vom physikalische Verhalten, beispielsweise in Hinblick auf die Löslichkeit, die Stabilität, Bioverfügbarkeit oder Abbaubarkeit gewählt. Kontrollierte oder konstante Freisetzung der erfindungsgemäßen Wirkstoffkomponente in der Zusammensetzung schließt Formulierungen auf der Basis lipophiler Depots ein (z.B. Fettsäuren, Wachse oder Öle). Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden auch Beschichtungen erfindungsgemäßer Substanzen oder Zusammensetzungen, enthaltend solche Substanzen, nämlich Beschichtungen mit Polymeren offenbart (z.B. Poloxamere oder Poloxamine). Weiterhin können erfindungsgemäßen



Substanzen bzw. Zusammensetzungen protektive Beschichtungen, z.B. Proteaseinhibitoren oder Permeabilitätsverstärker, aufweisen.

- 5 Erfindungsgemäße Trimere finden bevorzugt auch Verwendung im Bereich der In-vitro-Diagnose oder aber beispielsweise für biochemische Reinigungsverfahren. Zu denken ist an den Einsatz von erfindungsgemäßen Trimeren im Rahmen von biochemischen Reinigungsverfahren, insbesondere chromatographischen Verfahren, bspw. auf Reinigungssäulen, die mit derartigen Komplexen bepackt sein können, um bspw.
- 10 Zellen, die die korrespondierenden extrazellulären Rezeptoren exprimieren, isolieren zu können. Damit wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Verwendung von derartigen Komplexen auch zu Nachweiszwecken offenbart.

- Als weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung werden vorliegend Fusionsprote-
- 15 ine beschrieben, die zur Trimerisierung von geeignet sind, sofern das rekombinante Fusionsprotein mindestens eine Komponente A und mindestens eine Komponente B enthält, wobei die Komponente A ein Protein oder einen Proteinabschnitt mit biologischer Funktion, insbesondere mit Ligandenfunktion für Antikörper oder Rezeptoren enthält, und die Komponente B einen trimerisierenden Abschnitt oder ein funktionelles
- 20 Derivat eines solchen Abschnitts eines Proteins, wie als Bestandteil der erfindungsgemäßen Trimere oben beschrieben, enthält. Damit werden erfindungsgemäß alle jene rekombinanten Fusionsproteine offenbart, die zuvor als Bestandteile von erfindungsgemäßen Trimeren offenbart sind. Die obige Offenbarung – im Zusammenhang mit erfindungsgemäßen Trimeren - zu den Komponenten A und B bzw. zur Konstruktion
- 25 eines rekombinanten Fusionsproteins korrespondiert daher mit den Ausführungsformen eines erfindungsgemäßen rekombinanten Proteins selbst. So ist die Komponente B eines erfindungsgemäßen rekombinanten Fusionsproteins typischerweise ein Proteinabschnitt ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus der Familie der C1q-Proteine oder der Collectine bzw. aus der Familie der kollagenartigen Proteine, wobei die
- 30 Komponente B des rekombinanten Fusionsproteins vorzugsweise ausschließlich einen trimerisierenden Abschnitt enthält, aber keine die Trimere oligomerisierende Struktur oder globuläre „Kopf“-Domäne aufweist. Typischerweise wird die Komponente B

daher mindestens eine Aminosäuresequenz mit dem Heptadmuster (abcdefg)<sub>n</sub> aufweisen, das strukturell eine eine Tripelhelix bildenden Helix bildet, deren Aminosäuren in den Positionen a und d vorzugsweise apolare Seitenketten tragen und dadurch die Ausbildung der oben beschriebenen superhelikalen Struktur, hier als Tripelhelix aus drei Helices erlauben. Derartige Sequenzen aus mindestens einem Heptadmuster, vorzugsweise mindestens zwei können bspw. aus einem der folgenden Protein Keratin, Kollagen, C1q, MBP, SP-A, SP-D, BC, CL43 oder ACRP30 stammen. Auch ein funktionelles Derivat eines solchen Abschnitts der vorgenannten Proteine kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung zum Einsatz kommen, wobei die oben gewählte Definition eines funktionellen Derivats für die Komponente A entsprechend auch für die Komponente B gilt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Inhibitor, der als Hexamer (2x3) durch Ausbildung einer Disulfidbrücke in Lösung in vitro vorliegt (ApoFasL-060). In vivo liegt dieser Inhibitor – ggf. in oxidierendem Milieu - als Trimer vor oder verhält sich wie ein Trimer und entfaltet auf diese Weise inhibitorische Eigenschaften. ApoFasL-060 besteht aus einer N-terminalen Flag-Sequenz, einem Linker und einem spezifischen Linker sowie den AS 103 bis 138 aus hFasL und den AS 139 bis 281 (Komponente A), ebenfalls aus hFasL (s. Fig. 1). Analog kann ein Inhibitor der Art von ApoFasL-060 auch als Komponente A die entsprechenden Bindungsabschnitte anderer TNF-Cytokine tragen, bspw. OX40L, RANKL, TWEAK, Lta, Ltab2, LIGHT, CD27L, 41-BB, GITRL, APRIL, VEGI und BAFF bzw. deren Abschnitte oder Derivate in Betracht. Ganz besonders bevorzugt sind die Proteine CD40L, FasL, TRAIL, TNF (insbesondere TNF, das an den Rezeptor TNF-R2 bindet), CD30L und EDA bzw. deren Abschnitte oder Derivate, insbesondere deren jeweilige humane Sequenzen.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen FasL-Chimären (FasL-199, FasL-060 und FasL-267) im Ein-Buchstaben-Code. Die beiden Proteinchimären FasL-199 und FasL-267 enthalten einen Bestandteil des Proteins ACRP30, eines

Plasmaproteins, das strukturell ähnlich dem Komplement-Faktor C1q ist und von Adipozyten produziert wird. Das Protein ACRP30 hat nativ eine Länge von 247 Aminosäuren, wobei sie am N-Terminus eine Sekretionssignalsequenz (AS 1 bis 17), mit einer nachfolgenden Sequenz von 27 Aminosäuren (AS 18 bis 44), die für die Oligomerisierung des Proteins verantwortlich ist, aufweist. Der nachfolgende Abschnitt (AS 45 bis 110) des nativen Proteins enthält 22 kollagenartige Sequenzwiederholungen, die demnach die „coiled-Coil“-Domäne bilden. Diese coiled-Coil-Domäne sorgt im nativen Zustand für die Trimerisierung.

- 10 Die Proteinchimäre FasL-199 (Kontrolle) wurde mit Hilfe einer PCR-Amplifizierung konstruiert und enthält die vollständige Oligomerisierungsdomäne von murinem ACRP30 (mACRP30) (Aminosäuren 18 bis 110). C-terminal hiervon das FasL-Chimärenprotein die Trimerisierungsdomäne von FasL (Aminosäuren 139 bis 281). Linker-Sequenzen befinden sich zwischen dem N-terminalen Flag-Tag und dem
- 15 mACRP30-Abschnitt sowie zwischen mACRP30 (Komponente B) und dem humanen hFasL-Abschnitt (Komponente A) (LQ).

Das Chimärenprotein FasL-267 entspricht weitestgehend dem Konstrukt FasL-199, weist jedoch eine Deletion des mACRP30-Abschnitts auf. Es enthält nicht die Oligomerisierungsdomäne (Aminosäuren 18 bis 44) von ACRP30. Die Deletionsmutante

20 wurde durch PCR Verfahren aus dem EST-Klon AA673154 hergestellt. Die Deletion der Aminosäuren 18 bis 44 von mACRP30 bewirkt, daß das Konstrukt als Trimer vorliegt, wie durch die Gelfiltrationsexperimente gezeigt.

- 25 Das Chimärenprotein FasL-060 weist am N-Terminus eine Flag-Sequenz, gefolgt von einem Linker (GPGQVQLQ), einem spezifischen Linker, der eine Disulfidbrücke bilden kann, die AS 103 bis 138 von humanem FasL (hFasL) und schließlich als Komponente A die AS 139 bis 281 von hFasL auf. Je nach Ausbildung der Disulfidbrücke verhält sich ApoFasL-060 als Trimer oder als Hexamer.

30

Figur 2 zeigt in Figur 2A die Aktivität von ApoFasL-060 und ApoFasL-267 in vitro in Hinblick auf die Überlebensfähigkeit von Bjab-Zellen. Aufgetragen auf der y-Achse ist

jeweils die Absorbanz bei OD 490 nm, aufgetragen auf der x-Achse jeweils (in logarithmischer Darstellung) ist die Konzentration der zugegebenen Fusionsproteine für den Zytotoxizitätstest. Die optische Dichte bei 490 nm ist ein Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen (hohe optische Dichte entspricht einer geringen apoptotischen Wirkung der zugegebenen Substanzen und damit einer hohen Lebensfähigkeit der Zellen).  
5 Dargestellt sind die Kurvenverläufe für Assays mit ApoFasL-267 (o), ApoFasL-060 ( ), jeweils ohne Zugabe von kreuzvernetzendem Antikörper, oder jeweils unter Zugabe von kreuzvernetzendem Antikörper (•, ■). FasL-267 allein ist auch bei hohen Konzentrationen (d.h. geringer Verdünnung) für die Zellen nicht zytotoxisch – im Unterschied zu FasL-267 mit kreuzvernetzendem Antikörper.  
10

Figur 2B zeigt in einer Darstellung wie in Figur 2A die inhibitorische Aktivität von ApoFasL-267 (o) und ApoFasL-060 ( ). Um die inhibitorische Aktivität bestimmen zu können, wurden zur Auslösung der Apoptose oligomerisiertes FasL bei einer Konzentration von 50 ng/ml in allen Versuchen hinzugegeben.  
15

Figur 2C zeigt die Ergebnisse von Affinitätsuntersuchungen, und zwar vergleichend die Affinität von FasL-199 und FasL-267 gegenüber Bjab-Zellen. Hierbei konkurrieren ApoFasL-267 und FasL-199 mit ZB4-Antikörpern um die Bindung an Fas auf BJAB-Zellen. Aufgetragen ist der Prozentsatz von gebundenem ZB4 (einem anti-Fas-Antikörper) gegen die Konzentration von FasL-199 ( ) bzw. FasL-267 (o). Innerhalb der Meßungenauigkeiten ergab sich kein Unterschied in Hinblick auf die Affinität der beiden FasL-Liganden. Damit konnte gezeigt werden, daß der Unterschied der beiden Liganden in Hinblick auf deren Zytotoxizität nicht auf unterschiedlicher Bindungsaffinität an den Rezeptor beruht.  
20  
25

Figur 3 zeigt die Ergebnisse von in vivo-Experimenten, und zwar die Wirkung der ApoFasL-060-Inhibition auf die durch agonistischen anti-Fas-Antikörper J02 induzierte Hepatolyse. Figur 3A zeigt die Ergebnisse von Versuchen, bei denen Mäusen intravenös entweder ApoFasL-060 (25 µg/Maus) oder Kochsalzlösung (Kontrolle) vor der intravenösen Injektion von 5 µg J02-Antikörper injiziert wurde. Die ausgefüllten Balken in Figur 3A stellen die Seramtiter (in U/ml) von ALT und die offenen Balken von  
30

AST als Ergebnisse der Messungen vier Stunden nach iv Injektion dar. Die rechte Auf-  
tragung gibt das Ergebnis des Kontrollversuchs wieder. In Figur 3B ist die Überlebens-  
rate von Mäusen dargestellt, die 10 µg J02-Antikörper erhalten haben, und zwar nach  
Vorbehandlung mit Kochsalzlösung (ausgefüllte Balken) oder mit ApoFasL-060 (20  
5 µg) (hellgraue Balken, jeweils 2. von links) oder nur mit ApoFasL-060 (dunkelgraue  
Balken, jeweils dritter von links) oder mit ApoFasL-060 und kreuzvernetzendem Anti-  
körper (mittelgraue Balken, jeweils rechts), in Abhängigkeit von der Zeit nach Verab-  
reichung (2h, 4h, 24h). Nach 4 h ist keine der Mäuse, die ausschließlich agonistischen  
J02-Antikörper erhalten hat (schwarze Balken), am Leben, während der Inhibitor  
10 (hellgraue Balken) das Überleben der Mäuse nahezu vollständig ermöglicht. Damit  
verhindert ApoFasL-060 die Letalwirkung des agonistischen anti-Fas-Antikörpers J02  
in Mäusen. Durch kreuzvernetzenden Antikörper wird die inhibitorische Wirkung von  
ApoFasL-060 (mittelgraue Balken) wieder aufgehoben.

15 Figur 4 zeigt die Wirkung von ApoFasL-267 nach einem durch oligomerisiertes FasL  
induzierten Leberschaden. Figur 4 stellt die Ergebnisse aus Versuchen dar, bei denen  
den Mäusen intravenös entweder Kochsalzlösung oder 25 µg von ApoFasL-267 vor  
der intravenösen Injektion von oligomerisiertem FasL (FasL-199) injiziert wurde. Die  
Serumtiter von ALT (ausgefüllte Balken) und AST (offene Balken) wurden nach Ab-  
20 lauf von vier Stunden analysiert. Wiederum stellen die Balken die jeweiligen Titer in  
U/ml dar. Die Auftragungen in der Mitte und rechts in Figur 4 zeigen die Ergebnisse  
nach Gabe von agonistischem, d.h. Apoptose auslösendem FasL, die linke Auftragung  
stellt den Vergleichsversuch ohne Gabe von agonistischem FasL dar. Neben den Er-  
gebnissen von Kontrollexperimenten sind somit in Figur 4 die Ergebnisse von Versu-  
25 chen mit FasL-199 ohne protektiven Liganden und von FasL-199 in Kombination mit  
protektivem Liganden FasL-267 dargestellt.

In Figur 5 ist die Wirkung von löslichem FasL im Falle einer AAP-induzierten Hepati-  
tis dargestellt. Den Mäusen wurde intravenös entweder ApoFasL-267 (Figur 5A) oder  
30 ApoFasL-060 (Figuren 5 B und 5C) vor der intraperitonealen Injektion von AAP (300  
mg/kg) injiziert. Aufgetragen sind in den Figuren 5A und 5B die Titer (U/ml) von  
ALT (ausgefüllte Balken) und AST (offene Balken), die jeweils fünf Stunden nach der



Injektion gemessen wurden. Die linken Auftragungen in den Figuren 5A und 5B entsprechen den Vergleichsversuchen, während die rechte (Figur 5A) bzw. in Figur 5B die mittlere und die rechte Auftragung die Resultate nach Gabe der erfindungsgemäßen Inhibitoren darstellen. Figur 5C zeigt die relative Abnahme der Aminotransferase-Titer im Vergleich zu scheinbehandelten (Kontroll)-Tieren (100%).

Figur 6 stellt die Wirkung von ApoFasL-267 und ApoFasL-060 auf eine mit AAP behandelte Mäuseleber dar. Die Mäuse wurden, wie vorangehend in Figur 5 beschrieben, behandelt. 24 Stunden nach der Hepatitis-Induktion wurden die Lebern seziert und histologisch ausgewertet. Figur 6 enthält drei Abbildungen von histologischen Schnitten (Zugabe von AAP, Zugabe von AAP und ApoFasL-267 und schließlich ein Vergleichsansatz (Kontrolle) nach Zugabe von Kochsalzlösung). Die Behandlung der Mäuse mit ApoFasL-267 (oder ApoFasL-060, nicht dargestellt) verhindert Leberschädigungen, wie aus einem Vergleich mit dem histologischen Schnitt aus den Kontrolltieren erkennbar ist. Dagegen zeigen die Lebern von ausschließlich mit AAP behandelten Tieren Nekrose und Apoptose im zentralen Venula-Bereich, sinusoidaler entzündlicher Blutandrang und vakuolisierte Hepatocyten.

Figur 7A zeigt die cDNA-Sequenz sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Fas-Chimäre Fas-ACRP30 (MKB216). Das Konstrukt enthält die Aminosäuren 17 bis 172 der extrazellulären Domäne von Fas (also dem Fas-Rezeptor), fusioniert über einen Linker von 14 Aminosäuren an die vollständige Oligomerisierungsdomäne von murinem ACRP30 (Aminosäuren 18 bis 110). Aminoterminal enthält das Konstrukt außerdem eine Signalsequenz der schweren Kette von Ig sowie einen Flag-Tg. Des weiteren sind in der Figur die Restriktionsschnittstellen angegeben.

Figur 7B zeigt eine Restriktionskarte mit den angegebenen Schnittstellen des Konstrukts von Figur 7A.

30

In Figur 8 ist die Inhibitorwirkung von Fas-ACRP30 in vitro gegenüber FasL-vermittelter Apoptose bei A20-Zellen dokumentiert. Auf der y-Achse ist die Absorpti-



on bei 490 nm (Maß für die Überlebensfähigkeit der Zellen; vgl. auch Figur 2) aufgetragen, während auf der x-Achse die Konzentration des jeweiligen Fusionsproteins in ng/ml aufgetragen ist. Es wurde die inhibitorische Wirkung von Fas-ACRP30 mit derjenigen von Fas-Fc, einer dimeren Form von Fas, und derjenigen von Fas-COMP, einer pentamären Form von Fas, verglichen. Als Apoptose-induzierendes Agens diente die erfindungsgemäße FasL-Chimäre FasL-199. Das Fas-ACRP30-Konstrukt inhibiert die FasL-induzierte Apoptose mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 80 ng/ml. Dieser Wert ist vergleichbar mit demjenigen des pentameren Fas-Derivats Fas-COMP (35 ng/ml), während der IC<sub>50</sub>-Wert für (dimeres) Fas-Fc mehr als 1 µg/ml beträgt.

10

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Die folgenden experimentellen Gegebenheiten (a) bis (f) sind, soweit einschlägig und nicht entsprechende a.a.O. offenbarte Modifizierungen gelten, für die sechs nachfolgenden Ausführungsbeispiele heranzuziehen:

- (a) Vektorkonstruktionen für die FasL-, TRAIL-, TNFα- und CD40L-Fusionsproteine:
- 20 Die Trimerisierungsdomäne von FasL (AS 139-281) wurde aus humaner cDNA unter Verwendung der Oligonukleotide JT398 (ACT GCA GGA AAA AAA GGA GCT G) und J290 (CAA CAT TCT CGG TGC CTG TAA C) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in pCRII (InVitrogen) ligiert und die kodierende Sequenz, eingerahmt von den Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Eco*RI, dann, enthaltend ein für das Signalpeptid
- 25 von Hämagglutinin codierendes DNA-Fragment, einschließlich 6 Basen der im 5'-Bereich unübersetzten Sequenz (CAA AAC ATG GCT ATC ATC TAC CTC ATC CTC CTG TTC ACC GCT GTG CGG GGC) sowie das Flag-Epitop (GAT TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA), den Linker (GGA CCC GGA CAG GTG CAG), die Restriktionsschnittstellen *Pst*I, *Sal*I, *Xho*I und *Bam*HI, zwischen die Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Bam*HI eines modifizierten pCRII-Vektors (PS038, In-
- 30 Vitrogen, NV Leek, Niederlande) subkloniert, in dem die Basen 720-769 deletiert wurden (PS 038).

Der Expressionsvektor für FasL-199 wurde in folgender Weise konstruiert. Mittels des EST-Klons AA673154 wurde zunächst eine PCR-Amplifikation mit Hilfe der Oligonukleotide JT1147 (ACA ATG CAT GAA GAT GAC GTT ACT AC) und JT1148 (AGA CTG GAG AGC GGC TTC TCC AGG) durchgeführt. Die für die Aminosäuren 18 bis 111 des murinen ACRP30 kodierende Sequenz, eingerahmt von den Restriktionsschnittstellen NsiI und PstI in die PstI-Schnittstelle des für trimeren FasL kodierenden Vektors kloniert (dergestalt, daß die fusionierte NsiI/PstI-Schnittstelle auf der 5'-Seite der kodierenden Sequenz lag). Der Vektor zur Expression des Fusionsproteins FasL-167 (mit den AS 44-111 von mACRP30) wurde mit Hilfe des alternativen 5'-Oligonukleotids JT1421 (AAA ATG CAT GCA GGC ATC CCA GGA C) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in ein PCR-„blunt“ system ligiert und die Nsi/PstI-Kassette in den FasL-enthaltenden Vektor – wie oben beschrieben – subkloniert. Andere Fusionsproteine mit alternativen TNF-Cytokinen in Kombination mit ACRP30 wurden durch Substituierung der entsprechenden Sequenz von FasL im Expressionsvektor FasL-ACRP30 mit der jeweiligen Ligandensequenz in die Restriktionsschnittstellen PstI und EcoRI erstellt.

(b) Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine:

HEK293-Zellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode stabil transfiziert. Nach drei Tagen Inkubation wurden die HEK293-Zellen für zwei Wochen in einem Selektionsmedium kultiviert, das 800 µg/ml G418 enthielt (siehe auch a.a.O.: Schneider et al., J. Exp. Med. 1998). Diese stabil transfizierten Klone wurden entnommen und in 96 well“-Platten in Selektionsmedien verteilt. Die Überstände wurden mit Hilfe der anti-Flag Western-Blot-Technik in Hinblick auf die Präsenz des rekombinanten Proteins untersucht.

Die stabil transfizierten Zellen wurden für die Dauer von 10 bis 14 Tagen in 800 ml eines nicht-selektiven Mediums in Flaschen aufgezogen. Die Kultur wurde zentrifugiert und der Überstand filtersterilisiert. Fusionsproteine von FasL mit murinem ACRP30 (FasL-267 oder FasL-199) wurden dann in der folgenden Weise aufgereinigt. Die Überstände wurden mit NaCl und CaCl<sub>2</sub> versetzt (Endkonzentrationen von 150

mM bzw. 2 mM) und der pH-Wert mittels Salzsäure/Natronlauge auf 7,0 eingestellt. Daraufhin wurde das rekombinante Protein auf eine 1 ml M2-Agarose-Säule (Sigma, Schweiz) aufgebracht (0,5 ml/min, 48 h, 4°C), die Säule mit 10 Volumina TBS, enthaltend 2 mM CaCl<sub>2</sub>, gewaschen und schließlich in TBS-EDTA (10 mM) (0,1 ml/min, 5 4°C) oder 50 mM Citrat-NaOH (pH 2,5) (1 ml/min, 4°C) eluiert und ggf. mit 0,2 Volumina von 1 M Tris-HCl (pH 8) neutralisiert. Der Puffer wurde gegen PBS in Konzentratoren mit einer 30kDA-Grenze (Millipore) ausgetauscht. Die Konzentration von gereinigten Proteinen wurde durch das Bicinchoninsäure-Verfahren (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard 10 bestimmt und die Reinheit der Proben durch SDS-PAGE und Coomassie-Blue-Färbung ermittelt.

(c) Zellen:

Die humanen T-Lymphoplastom-Jurkat-Zellen, BJAB Burkitt-Lymphomzellen oder 15 Raji-Zellen wurden in RPMI, begleitet von 10% FCS, aufgezogen. Die humanembryonischen Nierenzellen 293 wurden in einem DMEM Mehrstoffmix F12 (1:1), angereichert mit 2% FCS, kultiviert. Alle Medien enthielten Antibiotika (Penicillin und Streptomycin bei 5µg/ml jeweils und Neomycin bei 10 µg/ml).

20 (d) Zytotoxischer Assay:

Der zytotoxische Assay wurde im wesentlichen, wie zuvor bei Schneider *et al.* (J. Biol. Chem. 272:18827-18833, 1997) beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden 50.000 Zellen für die Dauer von 16 Stunden in 100 µl Medium inkubiert, wobei das Medium die angezeigten Ligandenkonzentrationen in Gegenwart oder Abwesenheit von 1µg/ml 25 M2-Antikörper enthielt. Die Zellüberlebensraten wurden mit Hilfe von PMS/MTS (Phenanzinmethosulfat 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, Salz) (Promega Corp., Madison, WI) bestimmt. Die Farbentwicklung wurde für die erforderliche Zeit (typischerweise 1-3 Stunden) zugelassen. Die Absorbanz wurde bei 490 nm gemessen. Die optische Dichte bei 490 nm 30 ist ein Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen (hohe optische Dichte entspricht einer geringen apoptotischer Wirkung der zugegebenen Substanzen und damit einer hohen Lebensfähigkeit der Zellen).

(e) **Behandlung der Mäuse**

Weiblichen Balb/c-Mäusen (8 bis 10 Wochen alt) wurden die verschiedenen Konstrukte intravenös injiziert. Das Ausbluten der Mäuse erfolgte nach den angegebenen Zeitintervallen mit nachfolgender Quantifizierung der Titer der Aminotransferasen AST und  
5 ALT (Aspartataminotransferase und Alaninaminotransferase)

(f) **Materialien**

Die anti-Flag-M1- bzw. anti-Flag-M2-Antikörper, gekoppelt an Agarose wurden von Sigma (Buchs, Schweiz) erworben. Die Antikörper J02 wurden von Pharmingen und  
10 die Zellkultur-Reagenzien von Life Sciences (Basel, Schweiz) erworben.

(g) **Bindungsstudie**

Die Affinität von ApoFasL-267 und FasL-199 wurde unter Verwendung eines Kompetitionssassays bestimmt. Die monoklonalen anti-Fas-Antikörper ZB4 wurden hierzu mit  
15 100  $\mu$ Ci ( $^{125}$ I) durch die iodo-Gen-Methode (Pierce, Rockford, IL) markiert. Dies führte zu einer spezifischen Aktivität von 1,5  $\mu$ Ci/ $\mu$ g Protein.  $1 \times 10^5$  Bjab-Zellen wurden mit radiomarkiertem ZB4 und nicht-markierten Kompetitoren in serieller Verdünnung (100  $\mu$ g/ml bis 10 ng/ml) für 1h bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschgängen mit kaltem PBS, das 1% BSA enthielt, wurde die an die Zellen gebundene Radioaktivität  
20 mit einem  $\gamma$ -Zähler bestimmt und als Prozentsatz von gebundenem cpm ausgedrückt. Alle Experimente wurden dreifach ausgeführt.

Im übrigen wird hinsichtlich der Beschreibung der für die Durchführung der Ausführungsbeispiele eingesetzten Methoden ausdrücklich auf Schneider et al. (J. Exp. Med.,  
25 Vol. 187, Nr. 8, 1998, 1205-1213) und die dort als Referenzen zitierten Publikationen verwiesen.

1. Ausführungsbeispiel

30 Es wurde ein rekombinantes Fusionsprotein (1, FasL-199) exprimiert, das die Aminosäuren 139 bis 281 des hFasL (h: human) als Komponente A und N-terminal von der

Aminosäure 139 der Komponente A als Komponente B eine 94 AA lange Sequenz (AS 18 bis 111 von mACRP30) aufwies. Darüber hinaus wurde am N-Terminus des Fusionsproteins (N-Terminal von der Komponente B) eine Flag-Sequenz mit den Aminosäuren DYKDDDDK und einer zwischen dem Flag-Tag und der Komponente B angeordneten Linkersequenz GPGQVQLQLH angekoppelt (s. Figur 1) exprimiert. Komponente A und B sind durch die Linkersequenz LQ getrennt.

Für Vergleichsversuche wurde ein Fusionsprotein (2, FasL-267) exprimiert, das N-terminal gleichfalls die vorgenannte Flag-Sequenz mit der gleichen C-terminal folgenden Linkersequenz und daran C-terminal angeschlossen die Aminosäuren 139 bis 281 von hFasL aufwies. Fusionsprotein (1) unterschied sich von Fusionsprotein (2) demnach durch eine Deletion, die den spezifischen Linker und die Aminosäuren 103 bis 138 von hFasL umfaßte (Figur 1).

Die Vektorkonstruktion der Fusionsproteine (1) und (2) erfolgte nach der oben beschriebenen Verfahrensweise. Die Expression und Reinigung der Fusionsproteine erfolgte nach dem unter (b) dargestellten Verfahren.

Der Multi- bzw. Oligomersierungsgrad der gereinigten Fusionsproteine (1 bzw. 2) wurde durch Elektronenmikroskopie bestimmt. Hierbei ergab sich, dass FasL-199 als Hexamer (2x3mer), entsprechende Messungen für FasL-267 ergaben Resultate für ein Trimer und für ApoFasL-060 ebenfalls ein Hexamer.

## 2. Ausführungsbeispiel

Inhibitorische Wirkung von ApoFasL-060 und ApoFasL-267 auf die Fas-vermittelte Apoptose in vitro.

Es wurden gemäß (c) gezüchtete Bjab-Burkitt-Lymphoma-Zellen entnommen und einem zytotoxischen Assay gemäß (d) unterzogen. Für diese Zelllinie wurde der Assay jeweils mit steigenden Konzentrationen von trimerisierten Fusionsproteinen ApoFasL-060 und ApoFasL-267 in Gegenwart oder Abwesenheit von anti-Flag-M2-Antikörpern (Sigma, Buchs, Schweiz) durchgeführt (Figur 2A), indem die Absorbanz bei OD 490



nm bestimmt wurde. Die eingesetzten Inhibitoren ApoFasL-060 und ApoFasL-267 sind in Figur 1 dargestellt (s. 1. Ausführungsbeispiel).

5 Beide Inhibitoren zeigen ähnliche Zelltod-induzierende Eigenschaften, wenn sie mit gegen den Flag-Tag gerichtete Antikörper kreuzvernetzt werden (Figur 2A). ApoFasL-060 induziert den Zelltod auch dann, wenn keine kreuzvernetzenden Antikörper vorhanden sind aufgrund seiner Aggregatstruktur. Damit zeigen die Ergebnisse des 2. Ausführungsbeispiels, daß ApoFasL-060 und ApoFasL-267 jeweils an den Fas-Rezeptor binden können, jedoch deren Oligomerisierung zur Transduktion des Todes-  
10 signals erforderlich ist. Hierbei ist die verringerte Zytotoxizität der beiden Inhibitoren nicht auf eine verringerte Affinität gegenüber dem Fas-Rezeptor zurückzuführen, da deren Affinität gegenüber oligomerisiertem FasL (FasL-199) nicht verringert ist.

Darüber hinaus wurden Bjab-Zellen mit steigenden Konzentrationen von ApoFasL-  
15 267 präinkubiert und anschließend FasL-199 zur Induktion der Apoptose hinzugefügt (s. Figur 2B). Hierbei zeigte sich, daß der durch FasL-199 induzierte Zelltod durch ApoFasL-267 verhindert werden kann. Die Messreihe lässt erkennen, daß ApoFasL-267 als trimeres Molekül den Zelltod in vitro mit einer inhibitorischen Konzentration (IC) von 100 ng/ml verhindern kann. Während also das in trimere Form vorliegende  
20 ApoFasL-267 die Apoptose durch die Blockade des Rezeptors verhindert, kann das aggregierende ApoFasL-060 die FasL-199 induzierte Apoptose in vitro nicht verhindern, da es aufgrund seiner Struktur selbst Apoptose-induzierend wirkt.

### 25 3. Ausführungsbeispiel

#### In vivo Versuche nach Hepatolyse-Induktion

##### A. Wirkung von ApoFasL-060

Hierzu wurden Mäusen agonistische J02-anti-Fas-Antikörper injiziert, die bei den der-  
30 art behandelten Mäusen zum Exitus durch fulminant verlaufendes Leberversagen führten. Die Hepatolyse bei diesen Mäusen wurde durch die hohen Serumtiter von Aminotransferasen (AST und ALT) nachgewiesen. Experimentell wurden die Mäuse mit ApoFasL-060 (1 mg/kg) vorbehandelt, wodurch das Tier nach Gabe von J02-



Antikörpern vor der von diesen ausgelösten Lebersversagen (Hepatolyse) bewahrt wurden (s. Figur 3A). Die protektive Wirkung von ApoFasL-060 war erwartungsgemäß dosisabhängig. Bei einer Gabe von 5 µg J02-Antikörper konnten AST- und ALT-Titer wie bei jenen Mäusen, die als Kontrolle dienten, beobachtet werden. Bei einer Dosis von 10 µg J02-Antikörper war eine überwiegende Schutzwirkung zu beobachten (Reduktion der AST- und ALT-Titer von ungefähr 90%). Im Ergebnis zeigte sich, daß ApoFasL-060 eo ipso nicht toxisch ist, sofern nicht ein kreuzvernetzender Antikörper (Figur 3B) eingesetzt wurde, so daß auch hier die Zelltod inhibierende Wirkung auf der Bindung an den Fas-Rezeptor ohne Auslösung des Todessignals beruht.

10

Die Letaldosis von J02-Antikörper (10 µg/pro Maus, intravenös injiziert) verursachten bei allen untersuchten Mäusen innerhalb von vier Stunden den Exitus (Figur 3B). Die Vorbehandlung dieser Tiere mit ApoFasL-060 reduzierte die Mortalität dramatisch – die Überlebensrate beträgt 86% nach 24 Stunden. Der Inhibitor ApoFasL-060 (allein injiziert) erweist sich als nicht toxisch – allerdings nach Co-Injektion mit kreuzvernetzendem Antikörper wirkt er hochtoxisch, mit einer Mortalitätsrate von 80% nach vier Stunden.

15

#### B. Wirkung von ApoFasL-267

In diesem Ausführungsbeispiel wurde den Mäusen entweder Kochsalzlösung (als Kontrolle) oder ApoFasL-267 vor der Injektion von FasL-199 injiziert. Anschließend wurde ein hepatolytischer Befund dieser derart behandelten Mäuse nach den jeweiligen Serumtitern von AST und ALT beurteilt (siehe Figur 4). Die mit ApoFasL-267 vorbehandelten Mäuse sind gegen die Hepatolyse, die durch das oligomere FasL (FasL-199) induziert wird, geschützt. Die FasL-induzierte Hepatolyse ist bei den zur Kontrolle eingesetzten Tieren sehr schnell (innerhalb von zwei Stunden) nach der Gabe von FasL-199 zu beobachten, nämlich mit Aminotransferase-Titern, die um den Faktor 10 erhöht sind. Die Vorbehandlung der Tiere mit ApoFasL-267 verhindert demnach nach Maßgabe der AST bzw. ALT-Serumtiter bestimmten Leberschaden der Tiere.

20

25

30

#### 4. Ausführungsbeispiel

##### **Inhibition der Acetaminophen (AAP)- induzierten Hepatitis**

Acetaminophen (AAP), ein Schmerzmittel, induziert bekanntermaßen fulminantes Le-  
berversagen. Der molekulare Mechanismus beruht auf Fas-vermittelter Apoptose. Es  
5 wurde im vorliegenden Ausführungsbeispiel daher untersucht, ob trimeres ApoFasL-  
267 und/oder hexameres ApoFasL-060 die Leberzellen vor AAP-induziertem Zelltod  
bewahren kann. Hierzu wurde den Mäusen eine subletale Dosis von AAP (0,3 g/kg)  
intraperitoneal injiziert. Fünf Stunden später wurden etwaige Leberschäden durch Be-  
10 stimmung der Seramtiter von ALT und AST ermittelt. Die ALT- bzw. AST-Titer wur-  
den entsprechend den IFCC-Richtlinien (International Federation of Clinical Che-  
mistry) als enzymatischer Test bestimmt. Die Gabe von ApoFasL-267 oder ApoFasL-  
060 verhinderte eine AAP-bedingte Erhöhung der AST- oder ALT-Titer. Im Vergleich  
zu unbehandelten Mäusen ergab sich zum Beobachtungszeitpunkt eine deutliche Ver-  
15 ringerung der Aminotransferase-Titer (75 bis 90%) bei den erfindungsgemäß vorbe-  
handelten Mäusen.

Der protektive Effekt der Vorbehandlung mit ApoFasL-060 erwies sich als dosisab-  
hängig (s. Figuren 5B und 5C). Im Fall einer Verabreichung von 25 µg ApoFasL-060  
20 (1 mg/kg) war keine AAP-induzierte Hepatolyse zu beobachten, im Fall einer Injektion  
von 12,5 µg ergaben sich leicht erhöhte Aminotransferase-Titer, also ein leichter Le-  
berschaden, noch niedrigere Dosen, z.B. 6 µg/Maus führten zu einem Verlust an pro-  
tektiver Wirkung. Bei diesen niedrigen Dosen ergab sich kein Unterschied zu den Kon-  
trolltieren, die nur mit Kochsalz-Lösung behandelt worden waren. Dies erlaubt die  
25 Feststellung, daß es sich bei der beobachteten Inhibition um eine kompetitive Beset-  
zung der Bindungsstellen auf dem Rezeptor handelt.

Die AAP-induzierte Leberschädigung wurde histologisch untersucht (Fig. 6A). Hierbei  
sind zu nennen: Nekrose und Apoptose im zentralen Venula-Bereich, sinusoidaler ent-  
30 zündlicher Blutandrang, vakuolisierte Hepatocyten. Dagegen, wie in der Figur 6B ge-  
zeigt, sind im Falle einer Vorbehandlung mit ApoFasL-267 (oder ApoFasL-060, nicht  
dargestellt) keine derartigen Leberschädigungen erkennbar.

## 5. Ausführungsbeispiel

### A. Konstruktion einer Chimäre des Fas-Rezeptors

5

Zur Herstellung eines äußerst wirksamen Inhibitors der FasL-vermittelten Apoptose wurde ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des Fas-Rezeptors (Aminosäuren 17 bis 172) und der vollständigen Oligomerisierungsdomäne von murinem ACRP30 (Aminosäuren 18 bis 110), welche über einen Linker von 14 Aminosäuren miteinander verbunden sind, hergestellt (Figur 7). Das rekombinante Protein wurde  
10 mittels SDS-PAGE analysiert und wies dabei ein apparentes Molekulargewicht von 55 kDa unter reduzierenden Bedingungen bzw. von 150 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf. Daraus ist zu schließen, daß das Konstrukt MKB216 (im folgenden Fas-ACRP30 genannt) im wesentlichen als Hexamer (2x3mer) vorliegt.

15

### B. Inhibitorische Wirkung von Fas-ACRP30 gegenüber FasL-vermittelter Apoptose

Um die inhibitorische Wirkung des erfindungsgemäßen Fusionsproteins Fas-ACRP30 gegenüber der FasL-vermittelten Apoptose in vitro zu belegen, wurden FasL-sensitive  
20 A20-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von Fas-ACRP30 vor der Zugabe von oligomerisiertem FasL vorinkubiert. Als besonders wirksames FasL-Oligomer diente im vorliegenden Experiment das erfindungsgemäße Konstrukt FasL-199. In dieser Weise wurde der inhibitorische Effekt des erfindungsgemäßen Konstrukts Fas-  
25 ACRP30 mit demjenigen einer dimeren Form von Fas (Fas-Fc) und einer pentamären Form von Fas (Fas-COMP) verglichen. Wie in der Figur 8 gezeigt, vermag eine Konzentration an Fas-ACRP30 von 80 ng/ml eine 50%ige Verminderung der FasL-vermittelten Apoptose hervorzurufen. Dieser Wert ist deutlich geringer als derjenige des dimeren Vergleichskonstrukts Fas-Fc ( $IC_{50} > 1 \mu g/ml$ ). Die inhibitorische Wirkung  
30 von Fas-COMP ist mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 35 ng/ml vergleichbar mit derjenigen von Fas-ACRP30. Diese Daten belegen somit, daß Fas-ACRP30 ein wirksamer Inhibitor der FasL-vermittelten Apoptose ist.

### **Ansprüche**

5

1. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Fusionsprotein mindestens eine Komponente A und mindestens eine Komponente B aufweist, wobei die Komponente A ein Protein oder ein Proteinabschnitt mit biologischer Funktion, insbesondere mit Ligandenfunktion für Antikörper, für lösliche oder membranständige Signalmoleküle oder für Rezeptoren oder ein Antikörper oder Abschnitt eines Antikörpers, umfasst und die Komponente B ein Protein oder einen Proteinabschnitt umfasst, der die Komponente A trimerisiert.
- 10 2. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponenten A der rekombinanten Fusionsproteine im Trimer identisch oder verschieden sind.
- 15 3. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente A der rekombinanten Fusionsproteine ein Peptidhormon, ein Wachstumsfaktor, ein Zytokin, ein Interleukin, ein Rezeptor, ein Abschnitt derselben oder ein funktionelles Derivat der vorgenannten Sequenzen ist.
- 20 4. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente A des rekombinanten Fusionsproteins ein Zytokin aus der Familie der TNF-Zytokine oder ein TNF-Zytokinrezeptor, ein Abschnitt eines solchen TNF-Zytokins oder -Rezeptors oder ein funktionelles Derivat eines TNF-Zytokins oder -Rezeptors bzw. eines Abschnitts eines solchen TNF-Zytokins oder -Rezeptors ist.
- 25 30

5. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente A des rekombinanten Fusionsproteins ein TNF-Zytokin oder ein Abschnitt eines TNF-Zytokins, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus CD40L, FasL, TRAIL, TNF- $\alpha$ , CD30L, OX40L, RANKL, TWEAK, Lta, Ltab2, LIGHT, CD27L, 41-BB, GITRL, APRIL, EDA, VEGI und BAFF, oder ein funktionelles Derivat der vorgenannten Sequenzen ist.  
5
6. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach einer der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente B einen Proteinabschnitt umfasst, der mindestens ein Heptadmuster einer Kollagendomäne aufweist.  
10
7. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente B einen Abschnitt des Proteins ACRP30 umfaßt, einschließlich der Trimerisierungsdomäne, ohne höhere Aggregate von Trimeren bilden zu können.  
15
8. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente B eine Aminosäuresequenz, wie gemäß Figur 1 für die Sequenz von Aminosäure 44 bis 111 von ACRP30 angegeben, oder ein funktionelles Derivat derselben enthält, wobei Figur 1 Bestandteil des Anspruchs ist.  
20
9. Trimer einer rekombinanten Fusionsproteins nach einem der vorgenannten Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Fusionsprotein die FasL-267-Sequenz gemäß Figur 1 aufweist, wobei Figur 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist.  
25
10. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Fusionsprotein zwischen Komponente A und Komponente B eine Linkersequenz aufweist.  
30



11. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Linkersequenz das Dipeptid LQ aufweist.
- 5
12. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Fusionsprotein eine vorzugsweise N-terminale Tag-Sequenz aufweist.
- 10
13. Trimer eines rekombinanten Fusionsproteins, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei der drei im Trimer enthaltenen rekombinanten Fusionsproteine verschiedene Komponenten B aufweisen.
- 15
14. Verwendung von Trimeren nach einem der Ansprüche 1 – 13 zur Herstellung eines Arzneimittels.
- 20
15. Verwendung von Trimeren nach einem der Ansprüche 1 – 13 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von viraler Hepatitis (HBV, HCV), Alkohol-induzierter Hepatitis, cholestatische Hepatitis, Wilsons Krankheit, autoimmuner Hepatitis, Abstoßungsreaktion bei Lebertransplantation, Erkrankungen, die auf hyperapoptotischen Reaktionen beruhen, degenerativen Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen, Entzündungserkrankungen, toxischer epidermaler Nekrolyse (TEN), Multiple Sklerose, Hashimoto Thyroiditis, GvHD.
- 25
16. Rekombinantes Fusionsprotein, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Fusionsprotein eine Komponente A und eine Komponente B enthält, wobei die Komponente A ein Protein oder einen Proteinabschnitt mit biologischer Funktion, insbesondere mit Ligandenfunktion für Antikörper oder Rezeptoren oder einen Antikörper oder Abschnitt eines Antikörpers oder für lösliche oder membranständige Signalmoleküle, ist und die Komponente B einen trimerisierenden Abschnitt oder ein funktionelles Derivat eines solchen Abschnitts eines
- 30

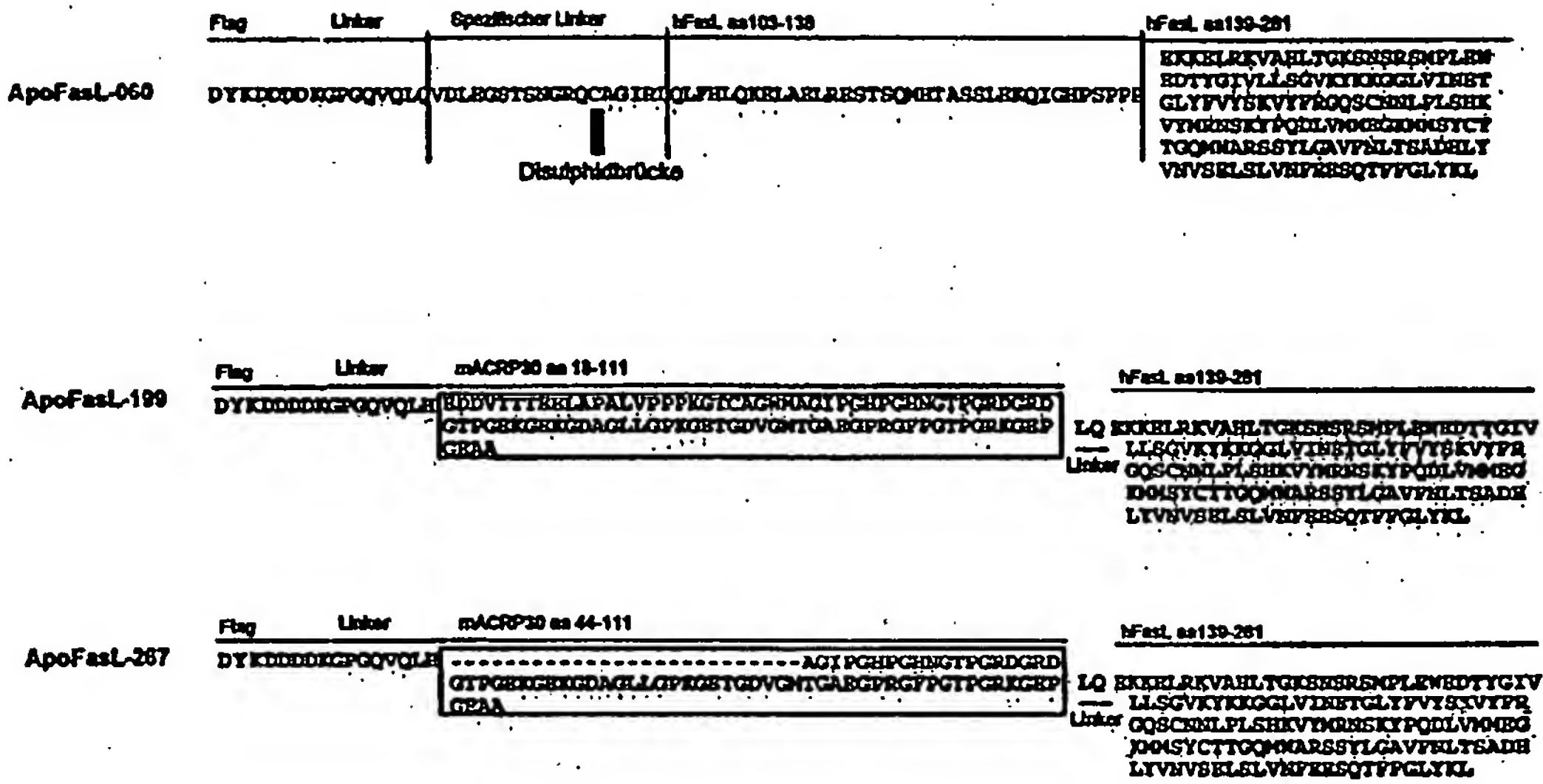
Proteins, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus der Familie der C1q-Proteine und der Collectine, enthält.

5 17. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz für ein rekombinantes Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 13 codiert.

18. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß der Expressionsvektor eine DNA-Sequenz nach Anspruch 17 enthält.

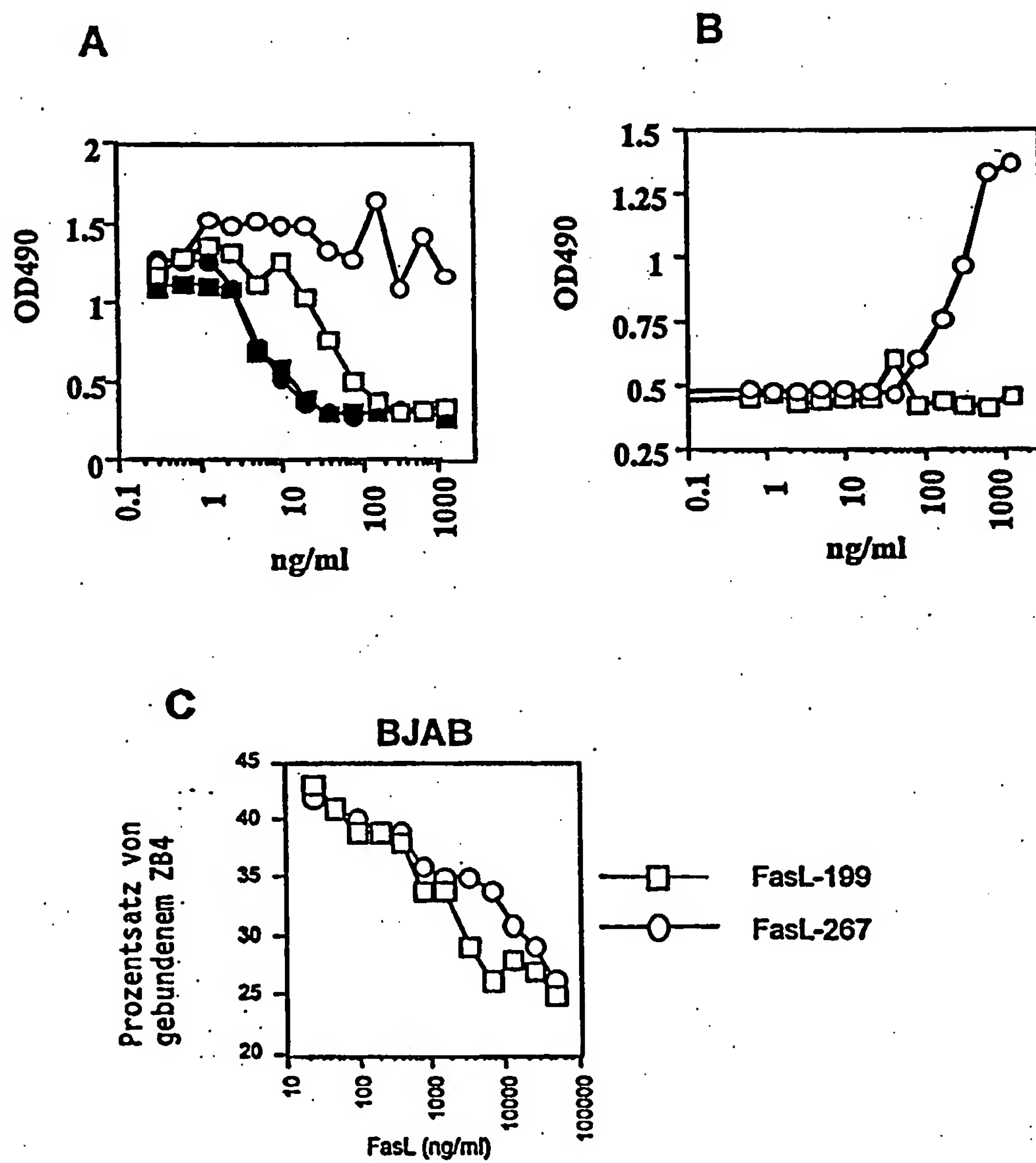
10 19. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 18 transfiziert ist.

Figur 1



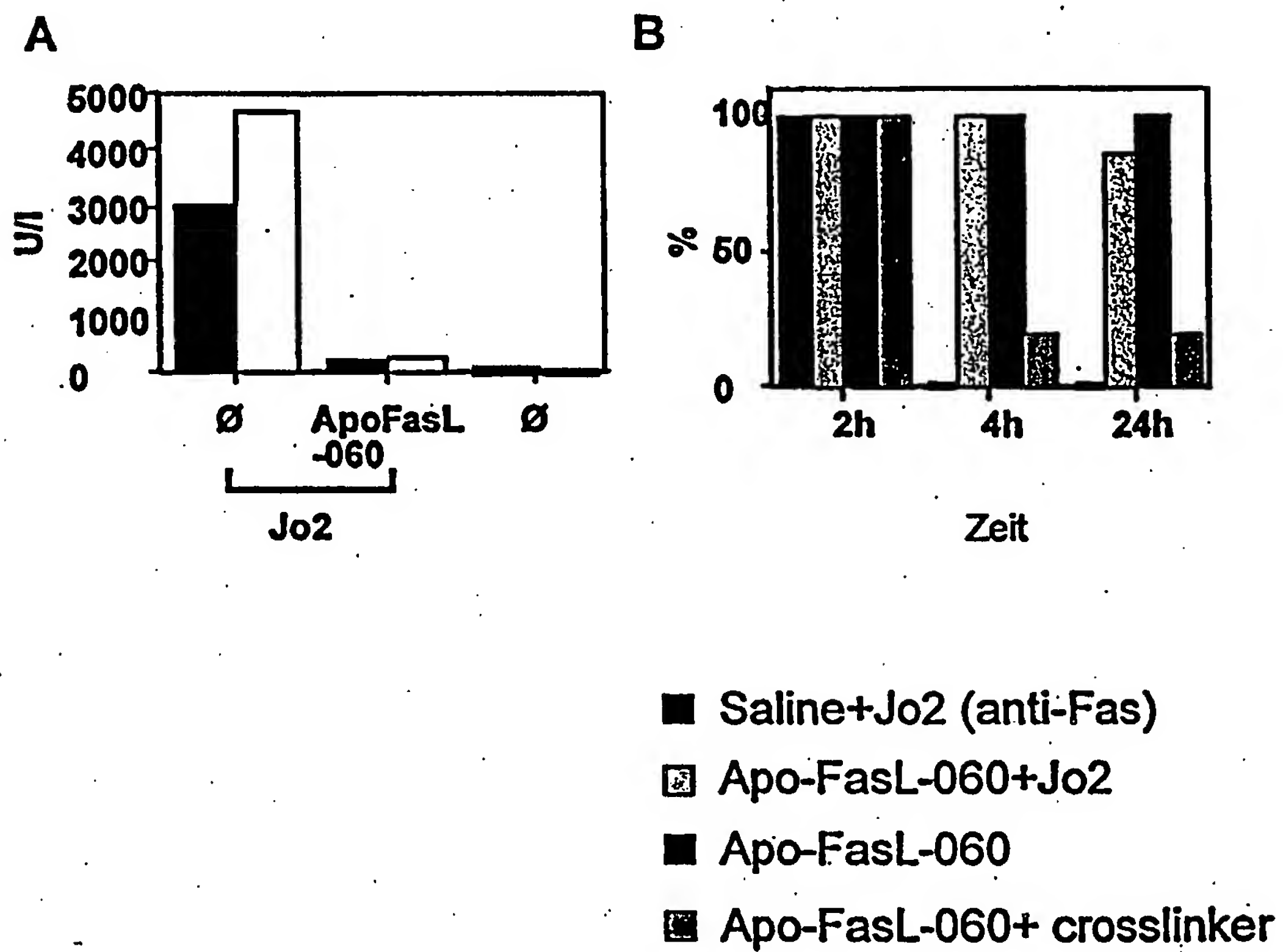
2/8

Figur 2



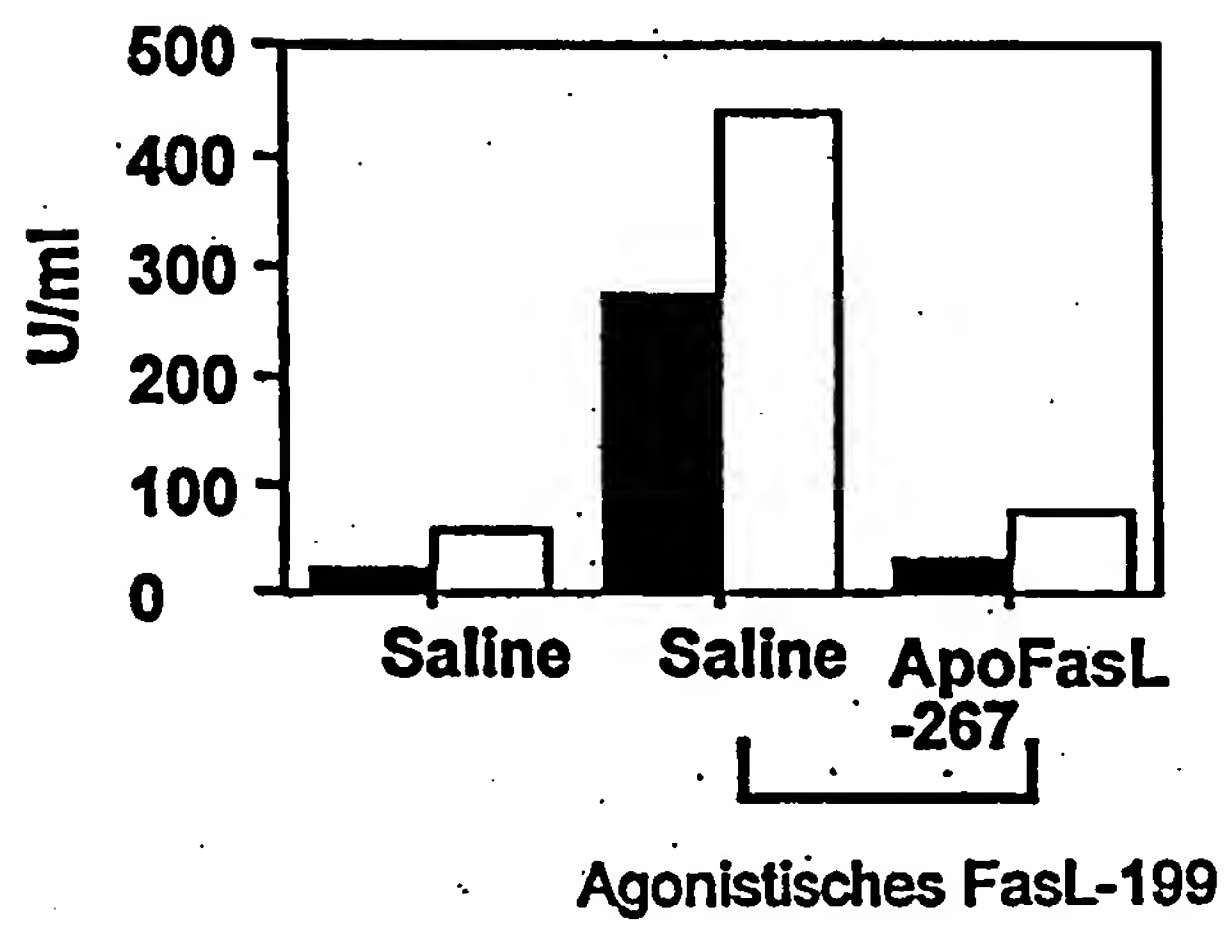
**Figur 3**

Leberschaden, ausgelöst durch Jo2 (anti-Fas-Antikörper)

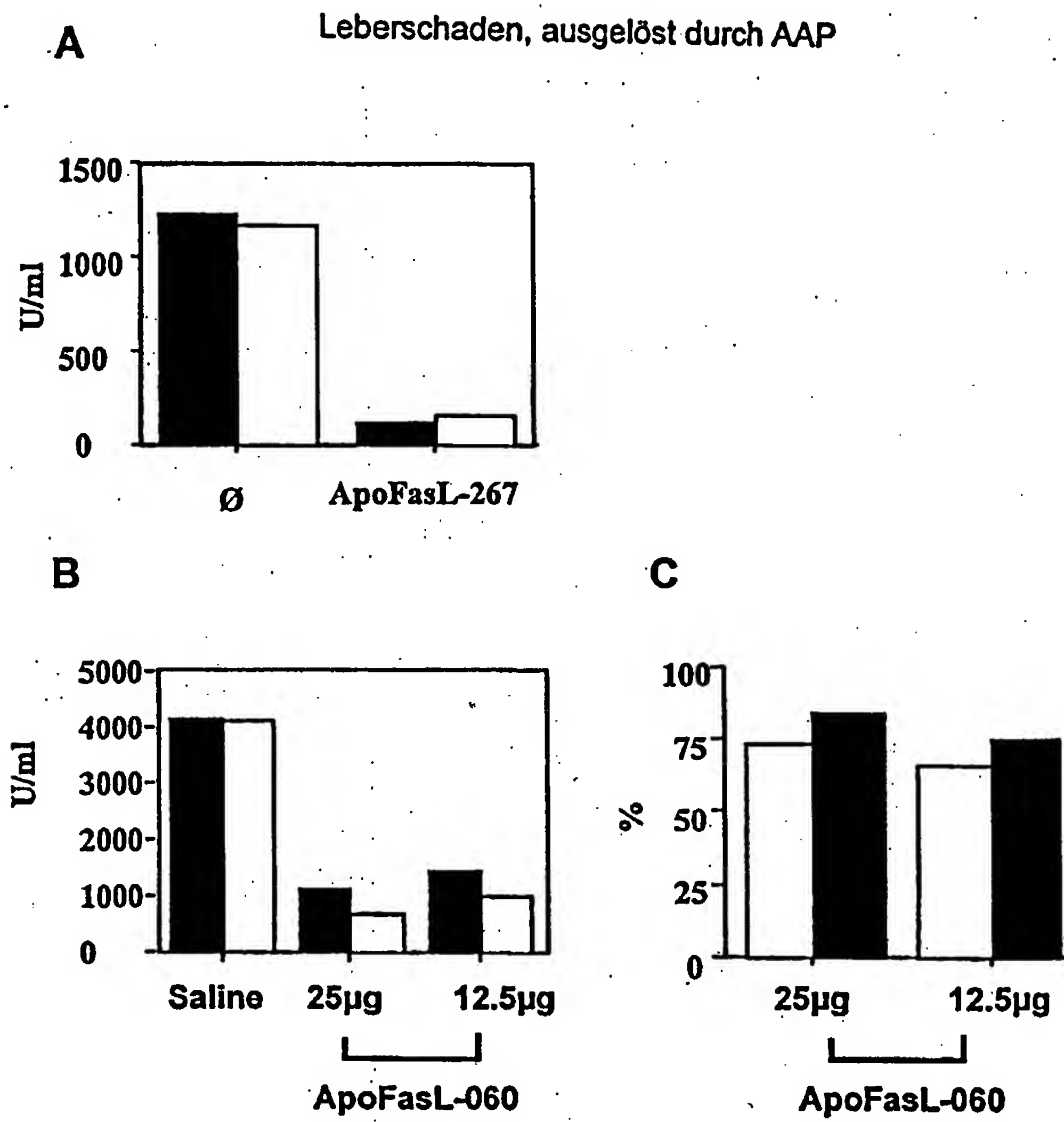




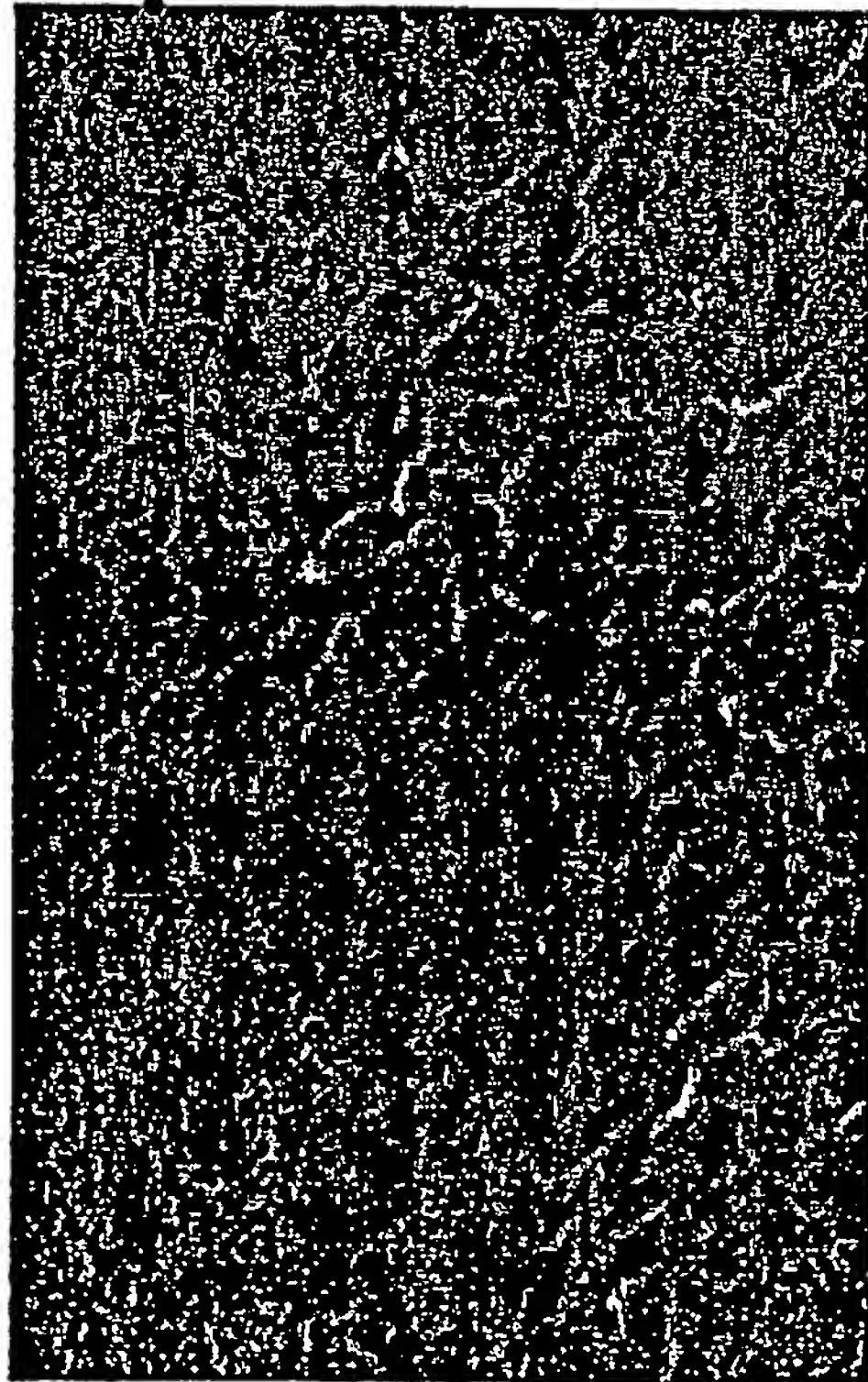
4/8

**Figur 4****Leberschaden, ausgelöst durch ApöFasL-199**

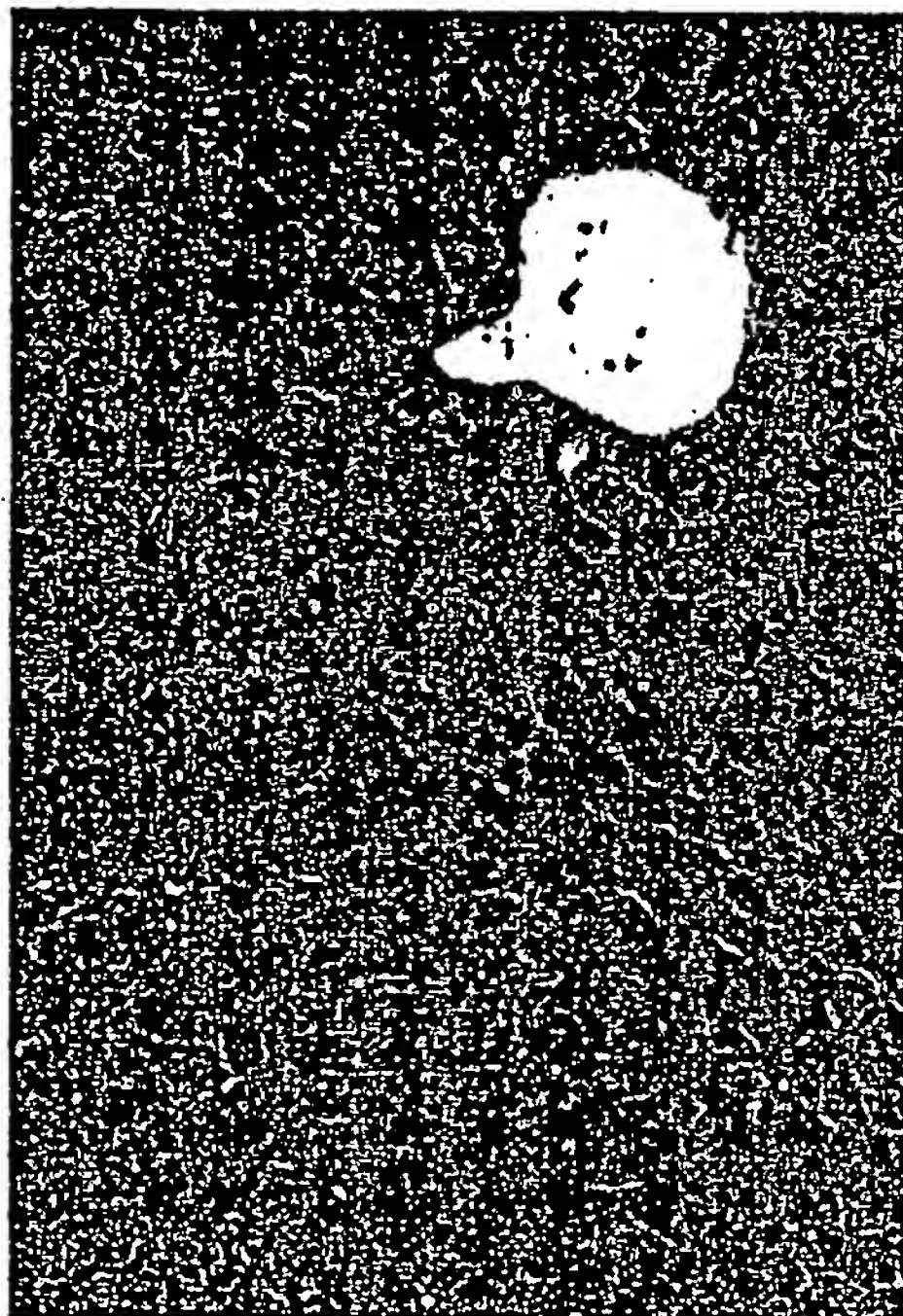
5/8

**Figur 5**

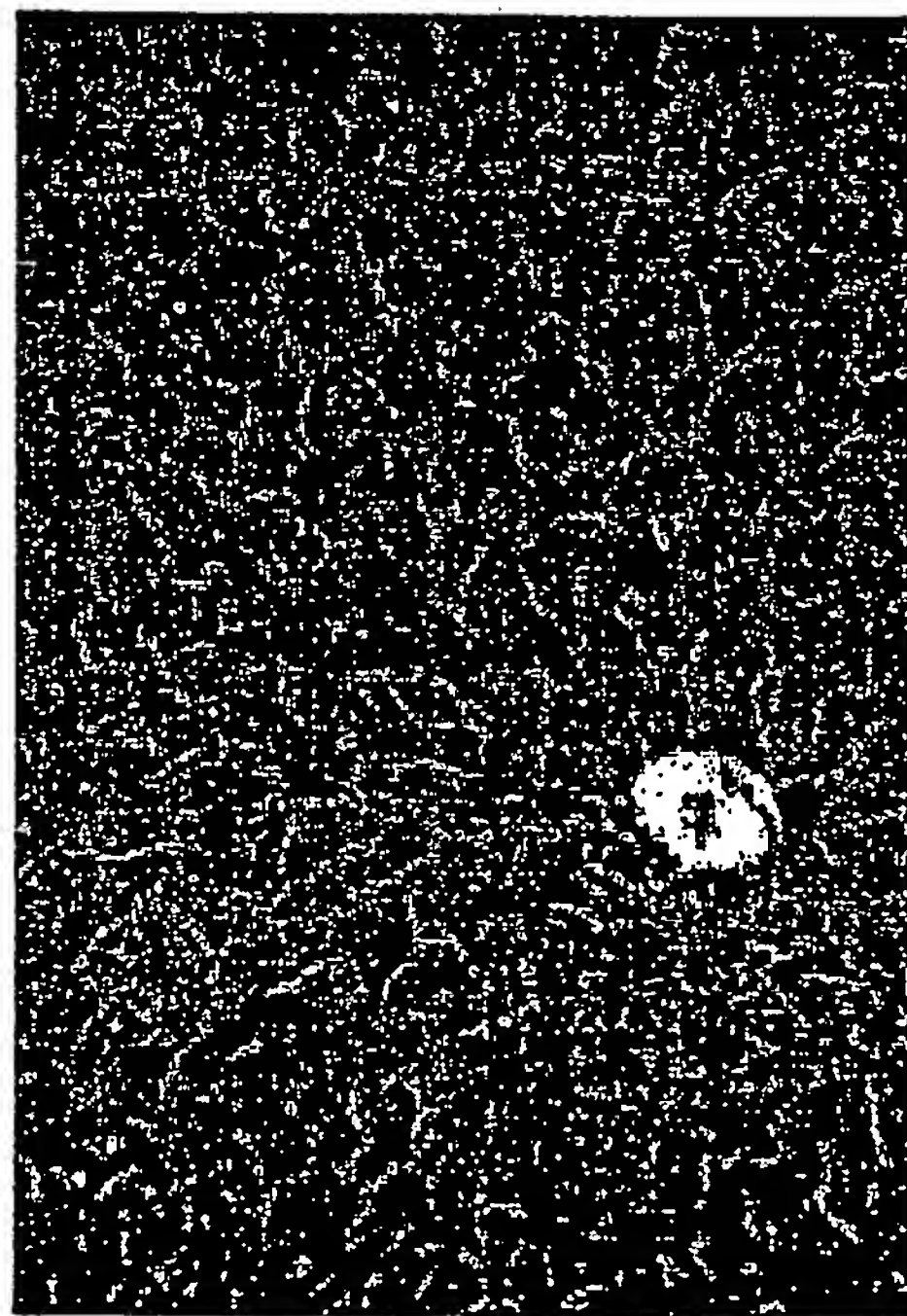
AAP



AAP+ APO-FASL 267



Kontrolle: saline

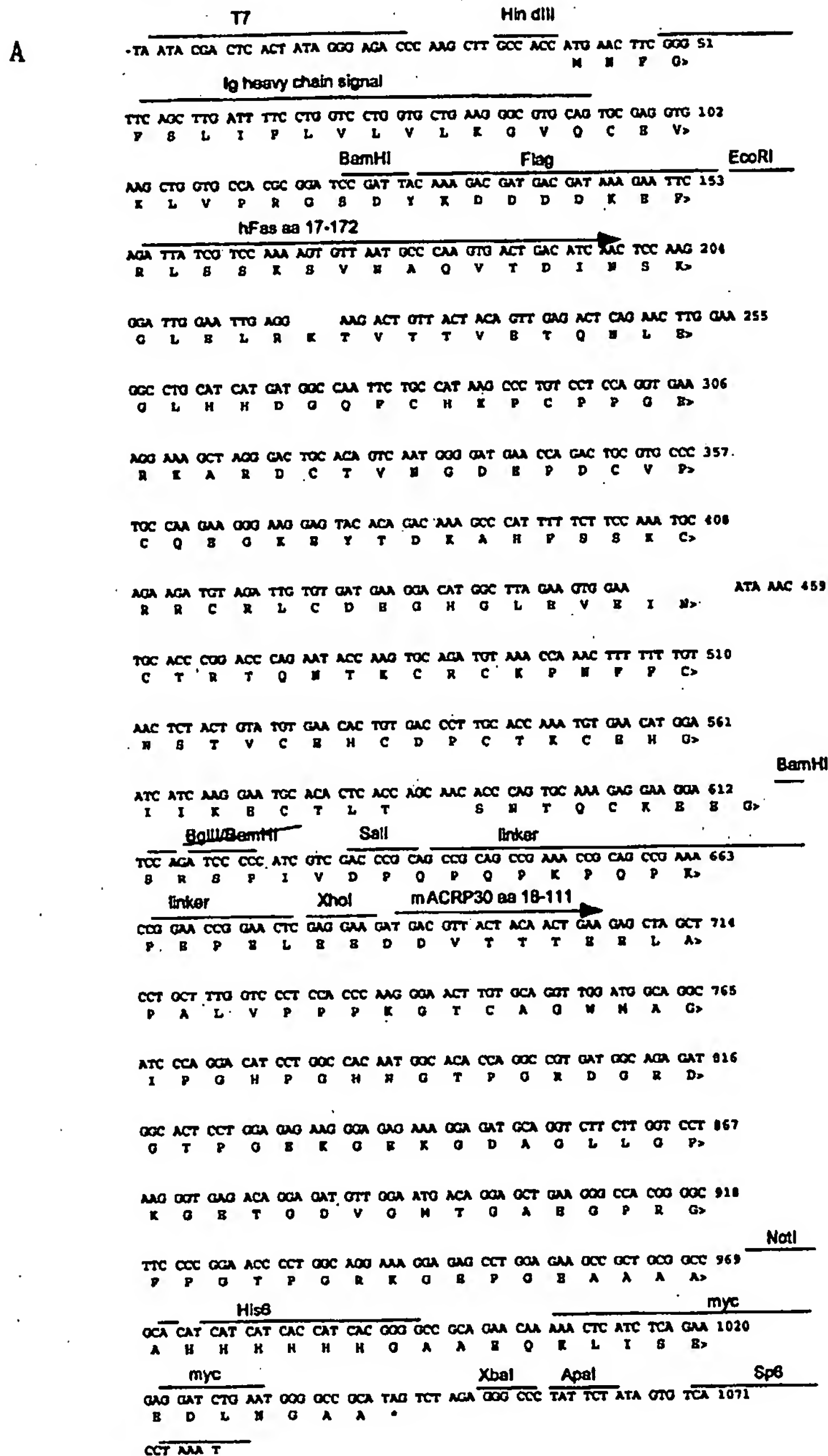


Figur 6

7/8

Figur 7

mkb216 Ig signal-Flag-Fas-ACRP30-myc

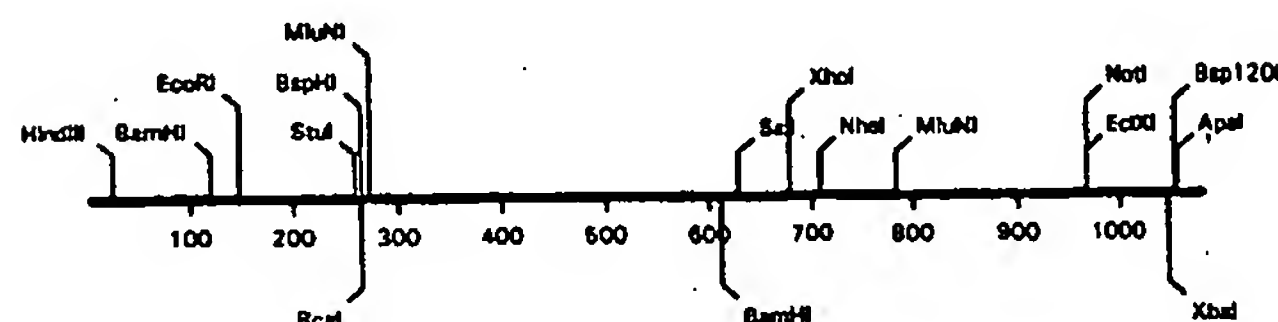


Enzyme	#Cuts	Positions
ApaI	1	1055
BamHI	2	118 810
Bsp120I	1	1051
BspHI	1	264
EcoRI	1	965
EcoRI	1	148
HindIII	1	28
MluNI	2	272 782
NheI	1	708
NotI	1	965
RcaI	1	264
SalI	1	628
StuI	1	257
XbaI	1	1045
XhoI	1	876

## Non cutters

AclII	MroI
AccBSI	MunI
AgeI	NaeI
Alw44I	NarI
AscI	NcoI
AsnI	NdeI
AvrII	NruI
BbeI	NsiI
BbrPI	PaeI
BclI	PinAI
BfrI	PmeI
BglII	Psp1408I
BlnI	PstI
BsiVI	PvuI
BspLU11I	PvuII
BssHII	SacI
Bst1107I	SbfI
BstBI	ScaI
ClaI	StuI
DraI	SfiI
Eco47III	SmaI
EcoRV	SnaBI
EheI	SpeI
FaeI	SphI
HpaI	SrfI
KasI	SspI
KpnI	SspBI
KspI	Swal
MluI	

Construction: PCR JT2326/JT2324 on ps579. Clone pBlunt → mkb213, XhoI/NotI of mkb213 in mkb182 → mkb216. Sequenced.

**B**

8/8

Figur 8

